

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS

**“EFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD
ANTITUMORAL *IN VITRO* DEL IMMUNEPOTENT CRP”**

POR

LIC. SILVIA ELENA SANTANA KRÍMSKAYA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA**

JULIO, 2017

“EFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL
IN VITRO DEL IMMUNEPOTENT CRP”

Comité de Tesis




Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Director de Tesis



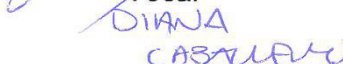
Dr. Moisés Armides Franco Molina
Secretario



Dr. Edgar Mendoza Gamboa
Vocal



Dr. Pablo Zapata Benavides
Vocal



DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Vocal

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Cristina Rodríguez Padilla.



Este trabajo de investigación (Tesis) se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del Laboratorio de Inmunología y Virología.

Agradecimientos

A la doctora Cristina Rodríguez Padilla por la confianza y el apoyo brindado en la realización de esta tesis.

A mis amigos quienes sin esperar nada a cambio, compartieron conmigo alegrías, tristezas y conocimientos.

Gracias a todas las personas que ayudaron directa e indirectamente a la realización de este proyecto.

Dedicatoria

A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como persona, por su incondicional apoyo a través del tiempo.

A mis maestros, quienes nunca desistieron al enseñarme, por su gran apoyo y motivación

Gracias a mis compañeros que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante estos dos años.

ÍNDICE

Contenido	Página
Índice de figuras	i
Lista de símbolos y abreviaturas	iv
Resumen	v
Abstract	vii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Cáncer	4
2.2 Inmunoterapia del cáncer	5
2.3 Extracto dializable de leucocitos (EDL)	5
2.4 IMMUNEPOTENT CRP	7
2.5 Metabolismo pre-sistémico	8
2.6 Enzimas	9
2.7 Pruebas de potencia	13
3. Justificación	15
4. Hipótesis	16
5. Objetivo general	17
6. Objetivos específicos	17
7. Material y métodos	18
7.1 IMMUNEPOTENT CRP	18
7.2 Enzimas	18
7.3 Líneas celulares	18
7.4 Animales experimentales	19
7.5 Diseño experimental	19
7.6 Determinación de la actividad enzimática de las proteasas	19
7.7 Determinación de la actividad enzimática de las nucleasas	20
7.8 Determinación de la actividad enzimática de polisacaridasas.	20
7.9 Determinación de la actividad de la lipasa	21
7.10 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con colagenasa	21
7.11 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con pepsina	21
7.12 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con proteasa neutra	21
7.13 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con proteinasa K	22

7.14 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con tripsina	22
7.15 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con validasa	22
7.16 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con desoxirribonucleasa I	23
7.17 Tratamiento del IMMUNEPOTENT con ribonucleasa A	23
7.18 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con α -amilasa	23
7.19 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con lisozima	23
7.20 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con lipozima	24
7.21 Ensayo de toxicidad celular	24
7.22 Determinación de la actividad antioxidante	25
7.23 Generación de la bolsa de aire	25
7.24 Inducción del linfoma	25
7.25 Tratamientos	25
7.26 Evaluación de la actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP en el modelo de linfoma murino	26
7.26 Análisis estadístico	26
8. RESULTADOS	27
8.1 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea MCF7 de cáncer de mama	27
8.2 Actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP	28
8.3 Determinación de la actividad de las proteasas	28
8.4 Efecto del tratamiento con proteasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP	29
8.5 Determinación de la actividad de las nucleasas	37
8.6 Efecto del tratamiento con nucleasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP	37
8.7 Determinación de la actividad de α -amilasa y lisozima	40
8.8 Efecto del tratamiento con polisacaridasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP	42
8.9 Determinación de la actividad de la lipasa	45

8.10 Efecto del tratamiento con lipasa sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP	45
8.11 Actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP en un modelo de linfoma murino	47
9. Discusión	51
10. Conclusión	57
11. Perspectivas	58
12. Literatura citada	68
13. Resumen biográfico	

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
Figura 1. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	27
Figura 2. Evaluación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.	28
Figura 3. Cuantificación de la cantidad de proteína de ovoalbúmina tratada con proteasas.	29
Figura 4. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con colagenasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	31
Figura 5. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con colagenasa.	31
Figura 6. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con pepsina sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	32
Figura 7. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con pepsina.	32
Figura 8. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteasa neutra sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	33
Figura 9. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteasa neutra.	33
Figura 10. Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteinasa K sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	34
Figura 11. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteinasa K.	34

Figura 12.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con tripsina sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	35
Figura 13.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con tripsina.	35
Figura 14.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	36
Figura 15.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa.	36
Figura 16.	Degradación del DNA plasmídico por la desoxirribonucleasa I y del RNA bacteriano por la ribonucleasa.	37
Figura 17.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con desoxirribonucleasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	38
Figura 18.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con desoxirribonucleasa.	39
Figura 19.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con ribonucleasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	39
Figura 20.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con ribonucleasa.	40
Figura 21.	Determinación de la actividad de la α -amilasa sobre un sustrato conocido.	41
Figura 22.	Determinación de la actividad de la lisozima sobre un sustrato conocido.	41
Figura 23.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	42
Figura 24.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa.	43

Figura 25.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	44
Figura 26.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima.	44
Figura 27.	Determinación de la actividad de la lipozima sobre un sustrato conocido.	45
Figura 28.	Efecto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama.	46
Figura 29.	Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima.	47
Figura 30.	Efecto del tratamiento con PBS en un modelo de linfoma murino.	48
Figura 31.	Efecto del tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) en un modelo de linfoma murino.	48
Figura 32.	Efecto del tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (3U) en un modelo de linfoma murino.	49
Figura 33.	Efecto del tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (5U) en un modelo de linfoma murino.	49
Figura 34.	Comparación del peso del tumor de ratones BALB/c con linfoma murino expuestos a diferentes tratamientos.	50

Lista de símbolos y abreviaturas

5-FU	5-fluorouracilo
μL	Microlitro(s)
μm	Microméetro(s)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAsa	Desoxirribonucleasa I
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDL	Extracto dializable de leucocitos
HCl	Ácido clorhídrico
ICRP	IMMUNEPOTENT CRP
kDa	Kilodalton
mg	Miligramo(s)
mL	Mililitro(s)
pH	Potencial de hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa	Ribonucleasa A
U	Unidad

RESUMEN

El extracto dializable de leucocitos (EDL) es una mezcla de moléculas de bajo peso molecular derivadas de tejido linfoide desintegrado, las cuales han sido empleadas para el tratamiento de diversas patologías tales como inmunodeficiencias, enfermedades infecciosas y como adyuvante en el tratamiento del cáncer.

El IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) es un EDL de bazo bovino producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (San Nicolás de los Garza, México). Debido a sus propiedades inmunomoduladoras y antitumorales su administración como terapia adyuvante ha extendido el período de sobrevivencia y mejorado la calidad de vida de pacientes con neoplasias.

El desarrollo de fármacos usualmente implica el estudio de la interacción de este con su sitio blanco. Sin embargo, pocos estudios analizan el efecto de las enzimas a las que se ve expuesto su compuesto resultando en una biodisponibilidad del fármaco menor a la estimada.

En este estudio evaluamos los efectos antitumoral y antioxidante *in vitro* del IMMUNEPOTENT CRP tratado con diferentes enzimas para determinar si su actividad biológica se veía afectada, encontrando que el IMMUNEPOTENT CRP tratado con enzimas disminuye de una manera dependiente de dosis la viabilidad celular de la línea MCF7 y presenta actividad antioxidante, independientemente del tratamiento enzimático (proteasas, nucleasas, polisacaridasas o lipasa) al que se vió expuesto. Además, implementamos por primera vez la inoculación de tumor en un modelo de bolsa de aire para demostrar que la actividad citotóxica del IMMUNEPOTENT CRP sobre líneas de cáncer, es una propiedad que se mantiene *in vivo*. Con estos resultados podemos concluir los diferentes tratamientos enzimáticos no afectan la actividad antitumoral ni antioxidante del

IMMUNEPOTENT CRP; sugiriendo que nuestro producto puede ser administrado por vía oral sin afectarse su actividad biológica.

Abstract

The dialyzable leukocyte extract (DLE) is a mixture of low molecular weight molecules, derived from disintegrated lymphoid tissue, which has been used for the treatment of diverse pathologies such as immunodeficiencies, infectious diseases and as an adjuvant therapy for cancer.

IMMUNEPOTENT CRP is a DLE obtained from bovine spleen and produced by the Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (San Nicolás de los Garza, México). IMMUNEPOTENT CRP has immunomodulatory and antitumor properties therefore, when administrated as an adjuvant therapy for cancer patients, it has increased their survival and quality of life.

The development of any nutraceutical drug usually implies studying the interaction between the drug and its target. However, only a few of these analyze the effect of extra-hepatic enzymes to which the compound is exposed, such as gastrointestinal enzymes. For these reason the bioavailability of the nutraceutical drug may be less than the expected.

In this study, we evaluated the *in vitro* antitumor and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP treated with different enzymes to determine if its biological activity was affected, we found that IMMUNEPOTENT CRP treated with enzymes decreases in a dose dependent manner the viability of MCF7 cell line and has antioxidant properties, regardless of the enzymatic treatment (proteases, nucleases, polysaccharidases or lipase) to which it was exposed to. Besides, we inoculated a tumor in an air pouch model for the first time to demonstrate that the cytotoxic effect of IMMUNEPOTENT CRP over cancer cells occurs *in vivo* as well. Based on our results we concluded that the different enzymatic treatments do not affect the antitumor activity of IMMUNEPOTENT CRP; suggesting that our product can be administrated orally without any loss of biological activity.

1. Introducción

El extracto dializable de leucocitos (EDL) es una mezcla heterogénea de sustancias de bajo peso molecular que derivan de tejido linfoide desintegrado. Se ha demostrado que el EDL es una opción terapéutica como adyuvante en el tratamiento de distintas enfermedades que cursan con alteraciones del sistema inmune incluyendo padecimientos oncológicos. El desarrollo de esta terapia ha progresado continuamente y se comercializa a nivel mundial para el tratamiento de enfermedades infecciosas, alergias, inmunodeficiencias y cáncer (Salinas-Jazmín et al. 2015; Viza et al. 2013).

El EDL proviene de diferentes sub-poblaciones celulares, cada una con funciones específicas, por lo tanto, el extracto es una mezcla compleja de diferentes compuestos biológicamente activos. La caracterización extensiva de cada uno de estos componentes activos aún no se ha logrado (Fudenberg 1976; Medina-Rivero et al. 2014).

El IMMUNEPOTENT CRP es un extracto dializable de leucocitos de bazo bovino producido por en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México). Debido a sus propiedades inmunomoduladoras y antitumorales su administración como terapia adyuvante ha incrementado el período de sobrevivencia y mejorado la calidad de vida de pacientes con neoplasias (Franco-Molina *et al.* 2006, 2008). Las vías de administración actualmente reportadas para el IMMUNEPOTENT CRP son: la vía oral e intramuscular. La vía oral es la más deseable especialmente para el tratamiento de enfermedades crónicas porque no es invasiva, no causa dolor y permite la administración de mayores volúmenes de tratamiento. No obstante, el IMMUNEPOTENT CRP se ve expuesto a la acción hidrolítica de las diferentes

enzimas presentes en el tracto digestivo, pudiendo afectar su biodisponibilidad y actividad biológica (Franco-Molina *et al.* 2008; Shire 2009).

El desarrollo de fármacos usualmente implica el estudio de la interacción de este con su sitio blanco. Sin embargo, pocos estudios analizan el efecto de las enzimas extra-hepáticas a los que se ve expuesto su compuesto, tales como las enzimas pancreáticas e intestinales. Por este motivo la biodisponibilidad del fármaco resulta ser menor a lo estimado (Gavhane y Yadav 2012).

Por otro lado, la vía de administración intramuscular es empleada cuando se requiere una respuesta fisiológica inmediata, o para administrar fármacos que son degradados por las secreciones del sistema digestivo (Golan *et al.* 2011). El inconveniente de la administración del IMMUNEPOTENT CRP por la vía intramuscular, es el dolor en el área de aplicación.

Para evaluar el efecto de las enzimas sobre la actividad biológica de un fármaco se emplean las pruebas de potencia. La potencia es la cantidad de compuesto necesaria para producir un efecto biológico determinado. Dicho efecto biológico debe ser: una propiedad del compuesto relevante para su actividad, cuantificable y comparable contra un estándar (Schrock 2012). En el presente estudio evaluamos dos propiedades del IMMUNEPOTENT CRP: su actividad antitumoral sobre la línea MCF7 de cáncer de mama y su actividad antioxidante.

El propósito de este estudio es evaluar si la acción de las principales enzimas presentes en el tracto digestivo que tienen efecto sobre biomoléculas específicas (proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos) son capaces de alterar las propiedades antitumorales y antioxidantes del extracto dializable de leucocitos de bovino IMMUNEPOTENT CRP.

La presente investigación está enfocada en determinar si la vía de administración del IMMUNEPOTENT CRP de forma oral puede emplearse en el paciente sin afectar sus actividades biológicas.

2. Antecedentes

2.1 Cáncer

El cáncer se origina a partir de una serie de mutaciones en células somáticas o de línea germinal que adquieren la capacidad de dividirse sin control ni orden formando un tumor. El tumor resultante, que comienza como una anomalía leve, aumenta de volumen, invade tejidos vecinos y, finalmente, se propaga a otras partes del cuerpo (metástasis) (Kasper *et al.* 2015).

En general, el comportamiento de las células cancerosas se caracteriza por carecer del control reproductivo que requiere su función original, perdiendo sus características fisiológicas y adquiriendo otras que no les corresponden, como la capacidad de evadir todos los mecanismos de muerte, tanto endógenos como exógenos, excepto uno: su crecimiento no es sostenible (Hanahan y Weinberg 2011).

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y muerte a nivel mundial. Anualmente se diagnostican 14 millones de casos nuevos y más de 8 millones de muertes asociadas a este proceso. Se estima que el 56% de los casos nuevos de cáncer y 62% de las muertes, ocurren en países en vías de desarrollo (Farmer *et al.* 2010; Lozano *et al.* 2012).

La terapia convencional usualmente implica resección quirúrgica del tumor primario seguida de terapias adyuvantes para tratar la enfermedad residual. Existen 3 fases principales para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad: local (altamente tratable), local con micro-metástasis (marginamente tratable) y local con metástasis distante (pronóstico reservado). El diseño de nuevas

opciones terapéuticas debe adecuarse al diagnóstico y tratamiento del paciente (Snook y Waldman 2013).

2.2 Inmunoterapia del cáncer

El sistema inmune tiene el potencial de reconocer y eliminar a las células neoplásicas, sin embargo, durante el desarrollo tumoral, las células malignas adquieren mecanismos inmunosupresores y de evasión (tales como la regulación negativa de variantes antigénicas). Consecuentemente, las funciones efectoras del sistema inmune y su persistencia se ven comprometidos. Este proceso se llama inmunoedición y es un factor clave para la progresión tumoral. La inmunoterapia es el enfoque terapéutico que consiste en reactivar o estimular a la respuesta inmune antitumoral del paciente (Blankenstein *et al.* 2012; Kazemi *et al.* 2015).

El mecanismo efector de la inmunoterapia es multifactorial y depende de la interacción con los diferentes componentes y vías del sistema inmune. Para obtener resultados satisfactorios los principales efectores antitumorales (linfocitos B, linfocitos T, células natural killer, células natural killer T y citocinas) deben ser reactivados o estimulados adecuadamente (Galluzzi *et al.* 2014).

La inmunoterapia se puede clasificar como activa o pasiva en base a su capacidad para re-activar el sistema inmune del paciente. Los anticuerpos monoclonales y la transferencia adoptiva de células T se consideran formas pasivas de inmunoterapia porque presentan actividad antitumoral intrínseca. Las vacunas contra el cáncer y los anticuerpos inhibidores de vías específicas, tienen efecto directo en la estimulación del sistema inmune, por lo que se les denomina inmunoterapia activa (Galluzzi *et al.* 2014).

2.3 Extracto dializable de leucocitos (EDL)

En 1955 Lawrence demostró que la administración del extracto soluble de leucocitos viables de un donador seropositivo para la prueba de la tuberculina, a un receptor seronegativo para la misma prueba, daba como resultado la seroconversión del receptor, es decir, la inmunidad mediada por células podía ser transferida de un donador a un paciente receptor (Lawrence 1955).

En esa época se atribuyó el fenómeno a los anticuerpos, sin embargo, Lawrence demostró que su extracto contenía sustancias con pesos moleculares menores a 20 kDa, mientras los anticuerpos son moléculas con un peso aproximado de 150 kDa. El extracto de Lawrence se denominó extracto dializable de leucocitos (Fudenberg 1989).

La caracterización físico-química del EDL se ha basado principalmente en la cromatografía. Mediante esta técnica se ha determinado que el EDL es una mezcla heterogénea de compuestos de diferentes pesos moleculares, y que la actividad biológica reside principalmente en las fracciones menores a 10 kDa (Medina-Rivero *et al.* 2014; Baram *et al.* 1966; Baram y Mosko 1962).

El EDL contiene múltiples componentes inmunológicamente activos y se sugiere que su actividad biológica se encuentra mediada por péptidos, ácidos ribonucleicos o una mezcla de ambos (Fudenberg 1989; Bisswanger 2014).

Actualmente se sabe que el EDL estimula la inmunidad celular del paciente. Se comercializa a nivel mundial y en países como México, China, Cuba y República Checa, es un fármaco aprobado para el tratamiento de enfermedades infecciosas, alergias, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias y cáncer (Vetto *et al.* 1976; Salinas-Jazmín *et al.* 2015).

El EDL puede ser de origen humano, porcino, bovino y murino, y su aplicación es independiente de la especie animal de la cual se origina. No existen efectos adversos en ninguno de los casos, además, el uso del EDL de origen animal

permite obtener grandes volúmenes en poco tiempo, a bajos costos de producción y manteniendo las mismas propiedades biológicas (Viza *et al.* 2013).

2.4 IMMUNEPOTENT CRP

El IMMUNEPOTENT CRP es un biocompuesto que consiste en una mezcla de factor de transferencia, péptidos y sustancias como carbohidratos, lípidos y sus combinaciones con un peso menor a 12 kDa. Se obtiene a partir de la desintegración de células linfoides de bazo de bovino, seguida por un proceso de diálisis, para obtener moléculas de bajo peso molecular, algunas de las cuales presentan propiedades inmunomoduladoras (Franco-Molina *et al.* 2008).

El IMMUNEPOTENT CRP es una sustancia con propiedades inmunomoduladoras, no antigénica, que puede ser liofilizada y mantenerse por un periodo prolongado sin pérdida de su potencial biológico. No transmite enfermedades infecciosas y no posee antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (Franco-Molina *et al.* 2008).

Se han determinado los porcentajes de proteínas (0.41%), humedad (99.32%), cenizas (0.13%) y grasa (0.14%), del IMMUNEPOTENT CRP. Además, se realizó el análisis químico-elemental encontrando la presencia de carbono (C), nitrógeno (N), oxígeno (O), sodio (Na), aluminio (Al), fósforo (P), magnesio (Mg) y cloro (Cl) por medio de microscopía electrónica de barrido (Cervantes Wong 2017).

A pesar de los beneficios clínicos del EDL en general, y del IMMUNEPOTENT CRP en particular, la caracterización extensiva de sus componentes y sustancias activas aún no se ha logrado (Medina-Rivero *et al.* 2014).

Se ha demostrado que el IMMUNEPOTENT CRP modula la producción de citocinas, incrementa el número de células inmunocompetentes (CD8⁺, CD4⁺, CD16⁺ y CD56⁺) de pacientes con cáncer (Franco-Molina *et al.* 2008), protege a

las células de la médula ósea de los efectos tóxicos de la quimioterapia (Coronado-Cerda *et al.* 2016), induce diferenciación en líneas celulares blásticas de leucemia mielode (Sierra-Rivera *et al.* 2016) y ocasiona muerte inmunogénica (Rodríguez-Salazar *et al.* 2017). También se ha demostrado que el IMMUNEPOTET CRP tiene efecto citotóxico directo sobre diferentes líneas tumorales (de humano y murino) y además ejerce un potente efecto antioxidante (Franco-Molina *et al.* 2006; 2011).

La principal vía de administración del IMMUNEPOTENT CRP es la oral, la cual es la más deseable especialmente para el tratamiento de enfermedades crónicas porque no es invasiva, no causa dolor y permite la administración de mayores volúmenes de tratamiento. No obstante, a pesar de ser la vía predilecta de administración, se desconoce el efecto de las enzimas hidrolíticas presentes en el tracto digestivo sobre el IMMUNEPOTENT CRP (Franco-Molina *et al.* 2008; Shire 2009).

2.5 Metabolismo pre-sistémico

La biodisponibilidad de nutraceuticos administrados por vía oral en el organismo se encuentra limitada por el metabolismo pre-sistémico que ocurre en el tracto gastrointestinal. Particularmente, las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal (proteasas, nucleasas, polisacaridasas y lipasas), son capaces de degradar a la mayor parte de los fármacos, limitando la exposición de sustancias a nivel sistémico (Pereira de Sousa y Bernkop-Schnürch 2014). Por ejemplo, la biodisponibilidad de saquinavir (un inhibidor de proteasa) y tacrólimus (un inmunosupresor) es menor al 20% (Kupferschmidt *et al.* 1998; Tuteja *et al.* 2001). Cabe destacar que el efecto del metabolismo pre-sistémico por lo general no forma parte de los estudios preclínicos en el desarrollo de nuevos fármacos (Gavhane y Yadav 2012).

2.6 Enzimas

Las enzimas son polímeros biológicos que catalizan la conversión de uno o más compuestos (sustratos) hacia uno o más compuestos diferentes (productos). Las enzimas no se consumen ni se alteran al participar en una reacción. Son además catalizadores altamente específicos. La especificidad de las enzimas confiere a las células vivas la capacidad para llevar a cabo de manera simultánea e independiente una amplia gama de procesos químicos (Murray 2010).

El mecanismo de acción enzimático corresponde al modelo de adaptación inducido de Daniel Koshland. De acuerdo con este modelo las enzimas y sus sustratos interactúan para formar un complejo de enzima-sustrato, el sitio activo se modifica para ajustarse mejor a la forma del sustrato. Al mismo tiempo, el sustrato también modifica su geometría, para encajar mejor en el sitio activo. Como resultado, la parte del sustrato que va a reaccionar queda perfectamente dispuesta respecto a los grupos del sitio activo que van a catalizar la reacción. El modelo de adaptación inducida fue confirmado por estudios biofísicos del movimiento de las enzimas durante la unión a su sustrato (Nelson *et al.* 2009).

La actividad de una enzima indica la rapidez con la que dicha sustancia cataliza la reacción de transformación de un sustrato en un producto y depende considerablemente de las condiciones de reacción como la temperatura, el pH, la concentración del sustrato o la presencia de inhibidores (Robinson 2015).

Las enzimas son muy sensibles cambios de temperatura, a bajas temperaturas, la mayoría de las enzimas tienen una baja actividad, ya que no hay suficiente energía para que la reacción que catalizan tenga lugar. Al incrementar la temperatura, la actividad enzimática aumenta, ya que las moléculas del sustrato se mueven con mayor rapidez y la frecuencia de colisiones con las enzimas es mayor. A temperaturas superiores a 50°C, la estructura terciaria de las enzimas

(que determina la forma de la mayoría de las proteínas) se destruye, causando la pérdida de su actividad (Murray 2010).

Las enzimas incrementan su actividad cuando se encuentran a un pH óptimo al cual mantienen su estructura terciaria, este es diferente para cada enzima. Valores de pH superiores o inferiores al pH óptimo provocan cambios en la estructura tridimensional de la enzima, que pierde su sitio activo (Nelson *et al.* 2009).

Cuando la concentración de la enzima se mantiene constante, al aumentar la concentración de sustrato aumenta la velocidad de la reacción catalizada, hasta que se satura la enzima. Cuando todas las moléculas de la enzima están unidas al sustrato, la velocidad de la reacción catalizada alcanza un máximo, y la adición de más moléculas de sustrato ya no acelera la reacción (Mathews *et al.* 2002).

De los diferentes tipos de enzimas conocidas, aproximadamente del 95% se encuentran comercialmente disponibles para fines de investigación, y la mayoría son enzimas hidrolíticas, utilizadas para la degradación de distintas sustancias naturales (Robinson 2015).

Colagenasa: La colagenasa es una proteasa que escinde el vínculo entre un aminoácido neutro (X) y la glicina en la secuencia Pro-X-Glic-Pro, que se encuentra con alta frecuencia en el colágeno. La colagenasa es única entre las proteasas por su capacidad para degradar las fibrillas de colágeno nativo de triple hélice que comúnmente se encuentran en tejidos conectivos, como la piel, los tendones, los vasos sanguíneos y los huesos (Van Wart *et al.* 1981).

Pepsina: la pepsina de una sola cadena (PM 33 kDa), es secretada por las células de la mucosa gástrica en forma de su zimógeno, el pepsinógeno (PM 40 kDa). El pepsinógeno se convierte en pepsina por el corte (catalizado por la misma enzima) de 42 residuos del extremo amino-terminal, proceso que es

favorecido por el pH ácido del jugo gástrico (2.0) (Zhao *et al.* 2011). La pepsina no es muy específica, hidroliza los enlaces en los que intervienen aminoácidos aromáticos, aunque también lo hace donde hay metionina y leucina (Furihata *et al.* 1980). El producto de la catálisis de esta enzima son péptidos de tamaño variable y algunos aminoácidos libres. La pepsina se utiliza para la digestión proteolítica de tejidos en parafina y fijados en formol (Franciosi *et al.* 2007).

Proteasa neutra: es una metaloproteasa no específica que hidroliza el extremo N-terminal de enlaces peptídicos de los aminoácidos leucina y fenilalanina. Se utiliza para el aislamiento celular y la disociación de tejidos (Griffin y Fogarty 1973).

Proteinasa K: es una serina proteasa de amplio espectro derivada del hongo *Tritirachium album*. Corta el enlace peptídico de aminoácidos aromáticos y alifáticos (Ebeling *et al.* 1974).

Tripsina: es una serina proteasa de cadena sencilla formada por 223 residuos aminoácidos. La tripsina corta los enlaces C-terminales de los residuos aminoácidos lisina y arginina; la hidrólisis no ocurre si hay un residuo de prolina en el extremo carboxilo del enlace peptídico (Cunningham 1954).

Validasa: es una proteasa ácida obtenida a partir de *Aspergillus oryzae*, pertenece al grupo de las proteasas aspárticas. Esta enzima corta la cadena β de la insulina en los residuos leucina-valina y tirosina-treonina (Vishwanatha *et al.* 2009).

Desoxirribonucleasa I: es una endonucleasa que corta el ácido desoxirribonucleico actuando sobre el enlace fosfodiéster adyacente a pirimidinas, para producir polinucleótidos con extremo terminal fosfato 5'. El producto de digestión más pequeño es un tetranucleótido. La

desoxirribonucleasa I hidroliza ácido desoxirribonucleico de cadena sencilla, doble y cromatina (mientras no se encuentre unida a histonas) (Cal *et al.* 1998).

Ribonucleasa: hidroliza ácido ribonucleico en los extremos de citocina y uracilo, cortando entre el grupo fosfato 3' de una pirimidina y el grupo hidroxilo del nucleótido adyacente (Aqvist y Anfinsen 1959).

Lipozima: es una lipasa derivada del hongo *Rhizomucor miehei* que cataliza la hidrólisis de triacilglicerol en glicerol y ácidos grasos (Pereira *et al.* 2004).

α -amilasa: es una enzima derivada del *Bacillus licheniformis* que cataliza la hidrólisis de enlaces α -(1,4) de polisacáridos de 3 ó más unidades de glucosa (Barman 1969).

Lisozima: hidroliza el enlace glucosídico β -(1,4) entre el ácido N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, el cual se encuentra presente en la pared celular de bacterias (Mintz *et al.* 1975).

Las enzimas del tracto gastrointestinal son las responsables del metabolismo pre-sistémico de todo fármaco. Estas enzimas limitan la absorción del fármaco como un mecanismo de defensa a moléculas extrañas; una vez que la sustancia es absorbida por el intestino, viaja a través de una red de vasos capilares hacia la circulación porta, y de ahí al resto de órganos del cuerpo (Gavhane y Yadav 2012).

Benet *et al.* (1996) y Wachter *et al.* (1996) fueron los primeros en sugerir que la biodisponibilidad de los fármacos puede verse afectada por la acción de enzimas presentes en el intestino. Por ejemplo, las peptidasas presentes en las secreciones intestinales y pancreáticas hidrolizan enlaces amida y de esta forma inactivan fármacos polipeptídicos (Benet *et al.* 1996; Wachter *et al.* 1996).

2.7 Prueba de potencia

La prueba de potencia es la determinación de la concentración de fármaco necesaria para producir una actividad biológica esperada. La actividad biológica es un atributo esencial de todo fármaco, por ende, la prueba de potencia es un componente importante del control de calidad. Esta prueba debe ser diseñada para medir una actividad biológica relevante y específica del producto, ser cuantificable y ser comparable contra un estándar (Schrock 2012).

La prueba de potencia se emplea para comprobar la consistencia entre lotes, como control de calidad de cada lote y para determinar la estabilidad del compuesto. Se puede realizar por medio de ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*; este último es el más adecuado debido a su alta reproducibilidad, rapidez y menor costo (Schrock 2012).

En estudios anteriores se ha empleado el tratamiento enzimático (con proteasas y RNAsas) con el propósito de determinar la naturaleza del EDL que contiene factor de transferencia, obteniendo resultados variados. El primero en utilizar este tipo de ensayos fue el doctor H. Sherwood Lawrence, quien expuso al extracto de leucocitos a una enzima específica (DNAsa o RNasa), observando que la transferencia de inmunidad era resistente al tratamiento enzimático (Lawrence 1955). Posteriormente Dressler y Rosenfeld trataron a su EDL con DNAsa, RNasa, proteasas y lo expusieron a calor, sugiriendo que la actividad de factor de transferencia es afectada por el tratamiento con RNasa y a temperaturas mayores a 90°C (Dressler y Rosenfeld 1974). El siguiente estudio fue realizado por Burger, encontrando que la actividad del factor de transferencia de su EDL es inhibida por el tratamiento con proteinasa K (Burger *et al.* 1979). Finalmente, Karhumäki, reporta que el EDL tratado con proteasas (proteínasa K) pierde su actividad de factor de transferencia (Karhumäki *et al.* 1988). Cabe mencionar que

los estudios realizados han analizado el efecto de proteasas y nucleasas (desoxirribonucleasa y ribonucleasa) sobre la actividad del factor de transferencia; pero no sobre otras actividades biológicas del extracto.

En el presente estudio evaluamos el efecto del tratamiento enzimático sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

3. Justificación

La vía de administración más favorable para un fármaco es la vía oral. Sin embargo, la presencia de enzimas hidrolíticas presentes en el tracto gastrointestinal pueden disminuir considerablemente su actividad biológica (Shire 2009).

El desarrollo de fármacos usualmente implica el estudio de su interacción con el sitio blanco y pocos estudios analizan el efecto de las enzimas del sistema gastrointestinal (proteasas, nucleasas, polisacaridasas y lipasas), a pesar de que estas son las responsables del metabolismo pre-sistémico. Por este motivo la actividad biológica del fármaco resulta ser menor a lo estimado (Gavhane y Yadav 2012).

Como parte de la explotación comercial del IMMUNEPOTENT CRP y debido a que no existen reportes de la degradación ó conservación de su actividad biológica por efecto de las enzimas del sistema gastrointestinal, en el presente estudio determinamos si la actividad antitumoral sobre la línea celular MCF7 y la actividad antioxidante son sensibles a la actividad enzimática, lo cual nos permitiría formular y administrar nuestro tratamiento en el paciente conservando o incrementando su efectividad.

4. Hipótesis

Las sustancias activas del IMMUNEPOTENT CRP son resistentes a tratamientos enzimáticos no afectando sus actividades antitumoral y antioxidante.

5. Objetivo General

Determinar si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP son afectadas por acción del tratamiento enzimático.

6. Objetivos Específicos

- 1) Determinar si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP son resistentes al tratamiento con proteasas.
- 2) Determinar si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP son resistentes al tratamiento con nucleasas.
- 3) Determinar si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP son resistentes al tratamiento con polisacaridasas.
- 4) Determinar si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP son resistentes al tratamiento con lipasa.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 IMMUNEPOTENT CRP. El IMMUNEPOTENT CRP es producido por el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (San Nicolás de los Garza, México). El IMMUNEPOTENT CRP es un producto dializado, liofilizado y libre de pirógenos. Una unidad del IMMUNEPOTENT CRP ha sido definida como el producto derivado de 15×10^8 leucocitos.

7.2 Enzimas. Proteasas: Colagenasa (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA), pepsina (0.8% pepsina, HCl 0.2 N) (DAKO, São Paulo, Brasil), proteasa neutra (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, New Jersey, USA), proteinasa K (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA), tripsina (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) y validasa (Valley Research, Austin, Tx, USA). Nucleasas: desoxirribonucleasa I (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) y ribonucleasa A (US Biologicals Salem, Massachusetts, USA). Lipasa: lipozima (Novo Industrials, Copenhagen, Dinamarca). Polisacaridasas: α -amilasa (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) y lisozima (MP Biomedical, Santa Ana, California, USA).

7.3 Líneas celulares. La línea celular MCF7 (ATCC® HTB-22™) de carcinoma mamario fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA. USA), cultivada en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B) (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA), e incubada en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C.

La línea celular L5178-R (LY-R) (ATCC® CRL-1722™) de linfoma murino fue obtenida de la ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA. USA), cultivada en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) suplementado con

10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina y anfotericina B) (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA), e incubada en atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C.

7.4 Animales experimentales. Ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas, fueron alimentados *ad libitum* con dieta balanceada para ratón (Harlan Teklan), a una temperatura ambiente de 25°C (± 1). Todos los procedimientos se llevaron a cabo bajo las reglas del Comité de Bioética Animal del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (CEIBA).

7.5 Diseño experimental. a) se demostró la actividad enzimática sobre un sustrato conocido; b) diferentes alícuotas del IMMUNEPOTENT CRP fueron incubadas con la enzima correspondiente, bajo condiciones óptimas de pH y temperatura; c) se inactivó las enzimas por medio de calor (10 minutos a 100°C); se realizó la curva de viabilidad del IMMUNEPOTENT CRP tratado y no tratado con las diferentes enzimas sobre la línea celular MCF7 de cáncer de mama; y f) se determinó si hubo cambios significativos en la actividad citotóxica del IMMUNEPOTENT CRP tratado con enzimas, respecto al IMMUNEPOTENT CRP no tratado.

También se demostró que la actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP es una propiedad del compuesto que se mantiene *in vivo* por medio de un modelo de linfoma murino inoculado en bolsa de aire.

7.6 Determinación de la actividad enzimática de las proteasas. Para confirmar la actividad hidrolítica de las proteasas se preparó una solución de ovoalbúmina (5 mg/mL) (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) a partir de la cual se realizaron las siguientes alícuotas: ovalbúmina (5 mg), ovalbúmina (5 mg) con colagenasa (1 mg), ovalbúmina con pepsina (3 µg), ovalbúmina (5 mg) con proteasa neutra (1 mg), ovalbúmina (5 mg) con proteinasa K (1 mg),

ovalbúmina (5 mg) con tripsina (1 mg) y ovalbúmina (5 mg) con validasa (1 mg). Las alícuotas fueron incubadas a 37°C por 2 horas y se determinó la concentración de proteína por medio del kit DC™ Protein Assay (BIO-Rad, Hercules, California, U.S.A.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.7 Determinación de la actividad enzimática de las nucleasas. Para confirmar la actividad enzimática de las nucleasas, se obtuvo el sustrato conocido (DNA plasmídico) por medio de una minipreparación siguiendo el protocolo de Ausbel con la siguiente modificación: no se agregó ribonucleasa A (RNasa) a la preparación, para poder obtener el RNA bacteriano.

La mezcla de ácidos nucleicos resultante fue cuantificada por medio de espectrofotometría utilizando el NanoDrop™ 2000 (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y se prepararon las siguientes alícuotas: ácidos nucleicos (DNA plasmídico y RNA bacteriano), ácidos nucleicos tratados con desoxirribonucleasa A (DNasa), ácidos nucleicos tratados con RNasa y ácidos nucleicos tratados con DNasa y RNasa. Las alícuotas fueron incubadas a temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos, a continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa (al 0.8%) y se tiñó el gel con bromuro de etidio (10 µg/mL). La visualización se realizó empleando el fotodocumentador Universal Hood II Electrophoresis Imaging Cabinet (BIO-Rad, Hercules, California, U.S.A.).

7.8 Determinación de la actividad enzimática de polisacaridasas. Para confirmar la actividad de la α -amilasa, se preparó agar (0.15 gr) (BD Biosciences, San José California, USA) con almidón (0.1 gr) en 10 mL de agua Milli-Q, y se vertió la preparación en 2 placas Petri de 3 cm de diámetro. Una vez solidificado se agregó α -amilasa (1 mg/mL) a una de las placas. Ambas placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora y teñidas con lugol (100 µl). Para confirmar la actividad de la lisozima, se preparó agar (0.15 gr) (BD Biosciences, San José

California, USA) con *Mycrococcus lysodeitikus* liofilizado (0.1 gr) (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) en 10 mL de agua Milli-Q, y se vertió la preparación en 2 placas Petri de 3 cm de diámetro. Una vez solidificado se agregó la lisozima (0.1 mg). Ambas placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora y se comparó la turbidez.

7.9 Determinación de la actividad de la lipasa. Para confirmar la actividad de la lipozima se preparó agar (0.15 gr) (BD Biosciences, San José California, USA) con aceite (2 mL) en 10 mL de agua Milli-Q, y se vertió la preparación en 2 placas Petri de 3 cm de diámetro. Una vez solidificado se agregó lipozima a una de las placas. Ambas placas fueron incubadas a 37°C por una hora y teñidas con Sudán III.

7.10 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con collagenasa. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 7.4, se agregó 1 mg de collagenasa (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con collagenasa fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.11 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con pepsina. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 2.0, se agregaron 3 µg de pepsina (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con pepsina fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.12 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con proteasa neutra. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a

pH 7.5, se agregaron 5 mg de proteasa neutra (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteasa neutra fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.13 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con proteinasa K. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 7.5, se agregó 10 mg de proteinasa K (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteinasa K fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.14 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con tripsina. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 7.0, se agregó 1 mg de tripsina (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con tripsina fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.15 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con validasa. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 3.0, se agregaron 100 mg de validasa (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 42°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.16 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con desoxirribonucleasa I. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 7.0, se agregaron 70 unidades de desoxirribonucleasa I (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 25°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con desoxirribonucleasa I fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.17 Tratamiento del IMMUNEPOTENT con ribonucleasa A. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 7.6, se agregaron 100 µg de RNasa (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con RNasa fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.18 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con α -amilasa. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM a pH 6.9, se agregó 1 mg de α -amilasa (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 20°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.19 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con lisozima. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 6.2, se agregaron 10 mg de lisozima (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 37°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.20 Tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con lipozima. 5 unidades del IMMUNEPOTENT CRP fueron resuspendidas en 1 mL de medio DMEM, a pH 8.0, se agregaron 4.3 mg de lipozima (de acuerdo con las indicaciones del fabricante). La mezcla se incubó a 55°C por 24 horas y se inactivó la enzima calentando a 100°C por 10 minutos. El IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima fue diluido en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino para obtener una concentración final de 2 U/mL.

7.21 Ensayo de toxicidad celular. Para determinar el efecto del IMMUNEPOTENT CRP y del IMMUNEPOTENT CRP con diferentes tratamientos enzimáticos sobre la línea celular MCF7 de cáncer de mama se realizó el ensayo de la resazurina (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, USA) como se describe a continuación.

Se sembraron células MCF7 en una placa de 96 pozos, a una concentración de 5,000 células por pozo, en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino. Se incubó la placa por 24 horas en una atmósfera con 5% de CO₂ a 37°C para permitir la adherencia de las células a la placa. A continuación, se decantó el medio de cultivo y se trató a las células con diferentes concentraciones (de 0.004 a 0.4 U/200µL) del IMMUNEPOTENT CRP tratado y no tratado con enzimas. Como control las células fueron expuestas a la misma concentración de enzimas, para garantizar que no fueran éstas las que afectaran la viabilidad celular.

Transcurridas 24 horas de tratamiento sobre las células, se decantó el medio de cultivo con tratamiento. Posteriormente se adicionó a cada pozo 100 µL de medio DMEM sin suplementar y resazurina al 10% (v/v) y se incubó durante 4 horas en condiciones estándar. Cumplido el tiempo de incubación las placas fueron leídas a una longitud de onda de excitación de 535 nm y de emisión de 595 nm en el lector de placas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

7.22 Determinación de la actividad antioxidante. Se determinó la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP por medio del ensayo del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) de acuerdo al método descrito por Liu y Nair (2010), con algunas modificaciones. Se preparó el MTT en agua Milli-Q (1 mg/mL), y en una placa de 96 pozos se agregaron 200 μ L/pozo del IMMUNEPOTENT CRP resuspendido en medio DMEM solo (1 U/200 μ L) o del IMMUNEPOTENT CRP expuesto al tratamiento enzimático (1 U/200 μ L) y 100 μ L del MTT. La placa se incubó a 37°C por dos horas. Cumplido el tiempo de incubación se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm en el lector de placas Synergy HT™ (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

7.23 Generación de la bolsa de aire. Para generar las bolsas de aire se siguió el protocolo descrito por Gaspar *et al.* (2014), con algunas modificaciones. Se inyectaron de forma subcutánea 5 mL de aire estéril en la espalda rasurada de cada ratón. Después de 3 días, se administraron 3 mL adicionales de aire estéril. Tres días después se inoculó el linfoma (2×10^6 células en 100 μ L de PBS) en la bolsa de aire. El aire estéril se obtuvo filtrando el aire en una campana de flujo laminar a través de un filtro Millipore (0.22 μ m) directamente a una jeringa de 10 mL. Para la inyección se emplearon agujas 30G x ½ (0.3 mm x 13 mm).

7.24 Inducción del linfoma. Para inducir el linfoma se inyectó dentro de la bolsa de aire a cada ratón 2×10^6 células L5178-R en 100 μ L de PBS estéril.

7.25 Tratamientos. El mismo día en que se indujo el linfoma, los ratones fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos para recibir los diferentes tratamientos descritos a continuación:

Grupo 1: se inyectó PBS en la bolsa de aire en un volumen de 500 μ L por 9 días.
Grupo 2: se inyectó 5-fluorouracilo (20 mg/kg) en la bolsa de aire en un volumen de 500 μ L por 9 días.

Grupo 3: se inyectó IMMUNEPOTENT CRP (3 U) en la bolsa de aire en un volumen de 500 μ L por 9 días.

Grupo 4: se inyectó IMMUNEPOTENT CRP (5 U) en la bolsa de aire en un volumen de 500 μ L por 9 días.

7.26 Evaluación de la actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP en el modelo de linfoma murino. Se sacrificaron los ratones al noveno día de la administración de la terapia. Los parámetros a considerar en la evaluación fueron la observación de la progresión tumoral y el peso de los tumores de cada grupo experimental

7.27 Análisis estadístico. Los resultados se presentan como el promedio de tres mediciones independientes y su desviación estándar (\pm). Se determinó si existe diferencia significativa ($P < 0.05$) o altamente significativa ($P < 0.01$) entre los tratamientos por medio del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba post hoc de Tukey o de Dunnett empleando el software de estadística SPSS ver 22.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

8. RESULTADOS

8.1 Efecto del IMMUNEPOTENT CRP sobre la viabilidad celular de la línea MCF7 de cáncer de mama.

El tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP indujo una reducción de la viabilidad celular dependiente de dosis sobre la línea celular MCF-7. Se observó una disminución altamente significativa (** $p < 0.01$) de la viabilidad celular a partir de la concentración de 0.16 unidades de IMMUNEPOTENT CRP por cada 200 microlitros (U/200 μ L). Las dosis letales (DL) 25, 50 y 100 encontradas con los tratamientos con IMMUNEPOTENT CRP, fueron las siguientes: DL₂₅ (0.2 U/200 μ L), DL₅₀ (0.24 U/200 μ L) y DL₁₀₀ (0.36 U/200 μ L) (Figura 1), estas dosis se emplearon para evaluar la actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP como se describe a continuación.

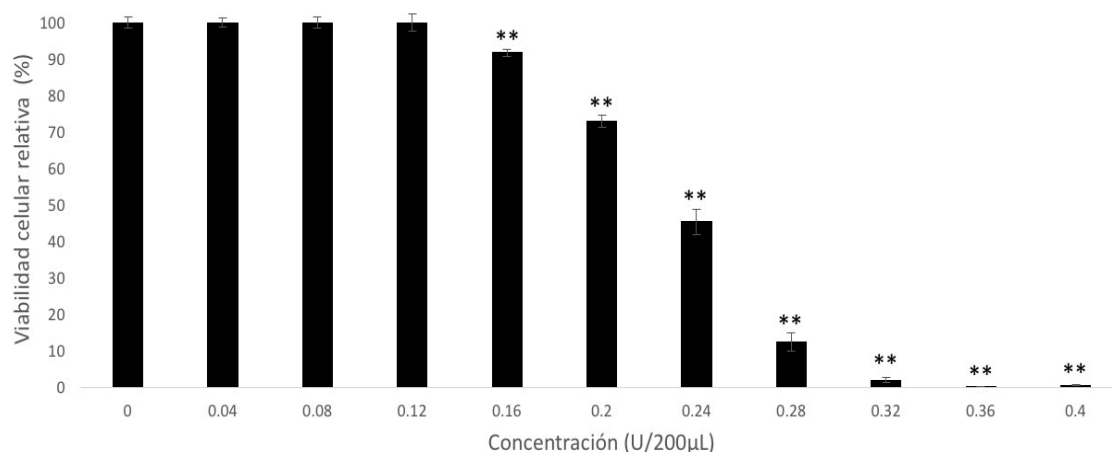


Figura 1. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células por pozo fueron sembradas en placas de 96 pozos y expuestas a diferentes concentraciones del IMMUNEPOTENT CRP (0 a 0.4 unidades) durante 24 horas. La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos y control.

8.2 Actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

El IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μ L) redujo el MTT a formazán, como se puede apreciar por el cambio de color amarillo del MTT al color morado del formazán (figura 2A), y por el incremento altamente significativo (** $p < 0.01$) en la absorbancia respecto al control (medio solo) (figura 2B).

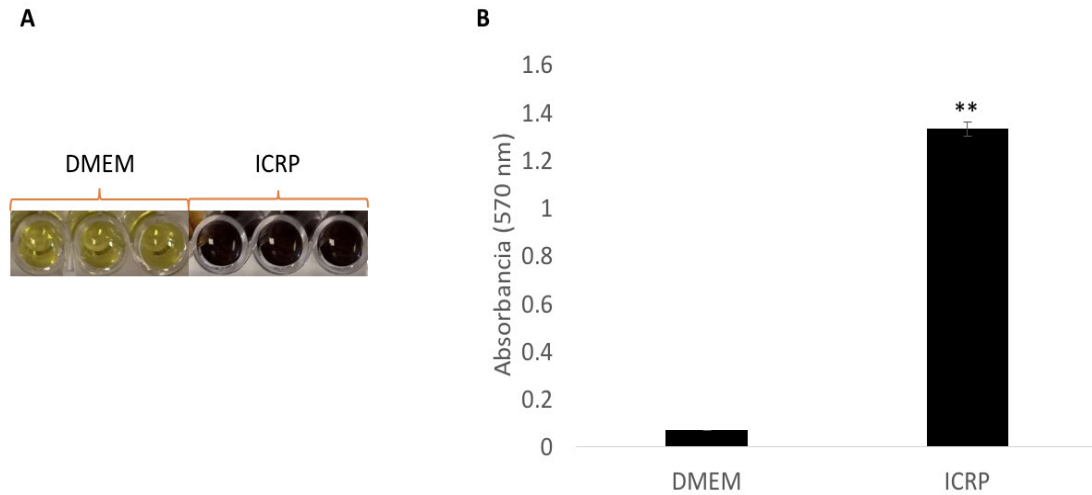


Figura 2. Evaluación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μ L/pozo del IMMUNEPOTENT CRP resuspendido en medio DMEM (1 U/200 μ L) o medio DMEM solo y 100 μ L de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para discernir si existe diferencia altamente significativa (** $p < 0.01$) entre tratamiento y control.

8.3 Determinación de la actividad de las proteasas.

Para determinar la funcionalidad de las proteasas empleadas en el estudio se corroboró su eficacia empleando como sustrato proteico ovoalbúmina a una concentración de 5 mg/mL. Encontrando una disminución altamente significativa (** $p < 0.01$) en la concentración de la ovoalbúmina dependiente de la proteasa empleada: colagenasa (2.39 mg/mL), pepsina (1.80 mg/mL), proteinasa K (1.95 mg/mL), proteasa neutra (1.28 mg/mL), tripsina (1.67 mg/mL) y validasa (1.62 mg/mL) comparado con el control (5 mg/mL) (Figura 3). Para determinar que estas enzimas no afectaran la viabilidad celular, estas fueron previamente

inactivadas con calor para posteriormente tratar las células MCF7, encontrando que los tratamientos con las distintas proteasas empleadas no afectaron ($*p<0.05$) la viabilidad celular (Figuras 4, 6, 8, 10, 12 y 14).

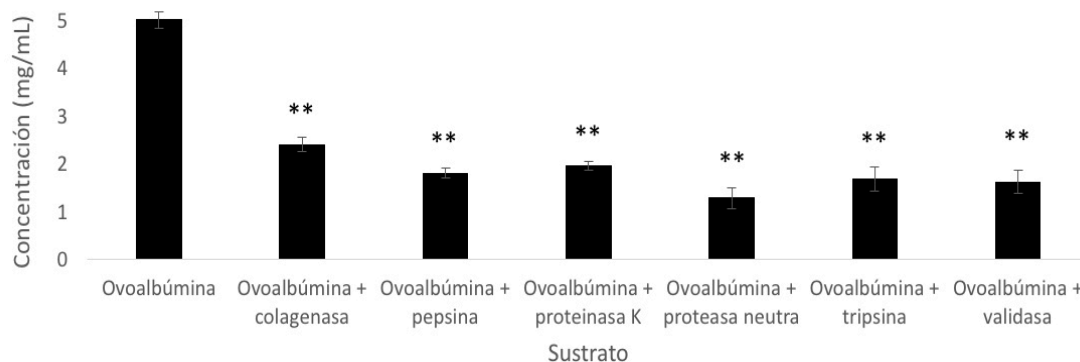


Figura 3. Cuantificación de la cantidad de proteína de oboalbúmina tratada con proteasas. Se realizó una dilución de oboalbúmina (Sigma, Chemical Company, St. Louis MO, Estados Unidos) en agua MiliQ, a partir de la cual se prepararon diferentes alícuotas (oboalbúmina, oboalbúmina + colagenasa, oboalbúmina + pepsina, oboalbúmina + proteasa neutra, oboalbúmina + proteinasa K, oboalbúmina + tripsina y oboalbúmina + validasa). Las alícuotas fueron incubadas a 37°C por dos horas. Posteriormente se cuantificó la cantidad de proteína de las alícuotas por el método de Lowry (BIO-Rad, Hercules, California, U.S.A.). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Dunnett para discernir si existe diferencia significativa ($*p<0.05$) entre tratamientos y controles.

8.4 Efecto del tratamiento con proteasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

Posteriormente se determinó que el tratamiento con las diversas proteasas sobre el IMMUNEPOTENT CRP no afectó de manera significativa ($*p<0.05$) su efecto biológico sobre la línea celular MCF7, disminuyendo la viabilidad celular de una manera dependiente de dosis (Figuras 4, 6, 8, 10, 12 y 14) y manteniendo su actividad antioxidante (Figuras 5, 7, 9, 11, 13 y 15).

De manera particular, se observó que el IMMUNEPOTENT CRP tratado con colagenasa (DL_{25}) indujo un mayor efecto citotóxico ($*p<0.05$) que el IMMUNEPOTENT CRP (DL_{25}), no observando diferencias ($*p<0.05$) entre estos tratamientos con las otras dosis empleadas (DL_{50} y DL_{100}) (Figura 4). No hubo

diferencia significativa ($*p<0.05$) en el efecto antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con colagenasa respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. La colagenasa no indujo cambio significativo ($*p<0.05$) en la absorbancia del MTT (Figura 5).

En los casos del IMMUNEPOTENT CRP tratado con pepsina (Figura 6), proteasa neutra (Figura 8), proteinasa K (Figura 10) o tripsina (Figura 12) se observó un mayor efecto citotóxico ($*p<0.05$) con las dosis DL₂₅ y DL₅₀, comparado con el IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. No se encontró diferencia significativa ($*p<0.05$) entre estos tratamientos con la DL₁₀₀. Tampoco se observó diferencia significativa ($*p<0.05$) en el efecto antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con estas enzimas respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. Ninguna de las enzimas evaluadas afectó significativamente ($*p<0.05$) la absorbancia del MTT (Figuras 7, 9, 11 y 13).

Finalmente, se obtuvo un menor efecto citotóxico ($*p<0.05$) con el IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa (DL₅₀), respecto al IMMUNEPOTENT CRP no tratado, no observando diferencias significativas ($*p<0.05$) entre estos tratamientos con las otras dosis empleadas (DL₂₅ y DL₁₀₀) (Figura 14). No hubo diferencia significativa ($*p<0.05$) en el efecto antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. La validasa no afectó significativamente ($*p<0.05$) la absorbancia del MTT (Figura 15A y B).

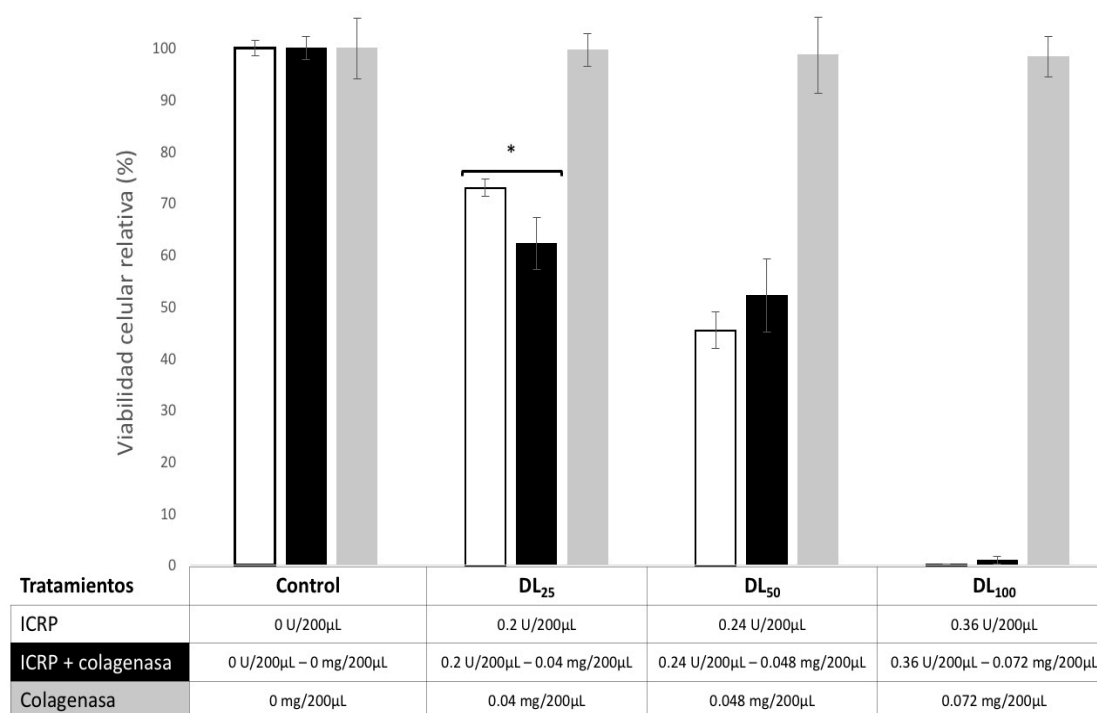


Figura 4. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con collagenasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con collagenasa por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

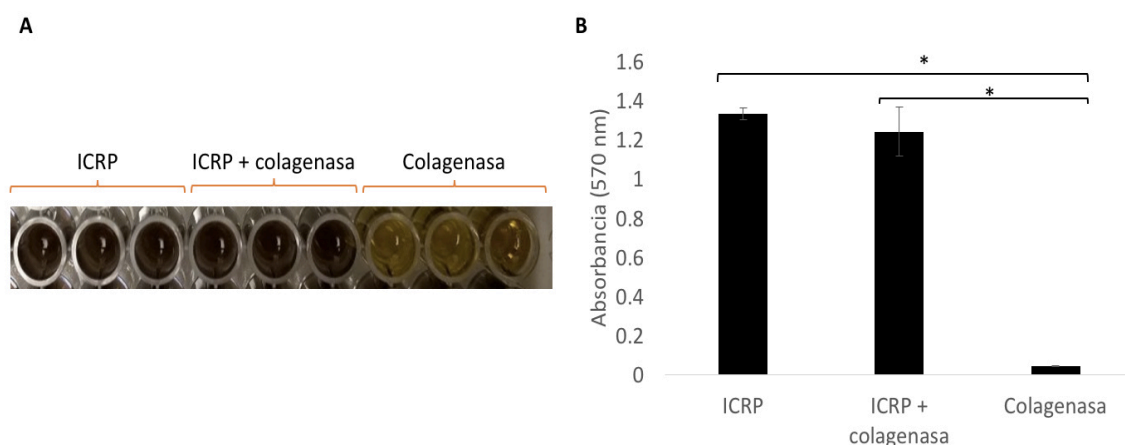


Figura 5. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con collagenasa. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μL) tratado con collagenasa (0.2 mg/200μL) o collagenasa (0.2 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

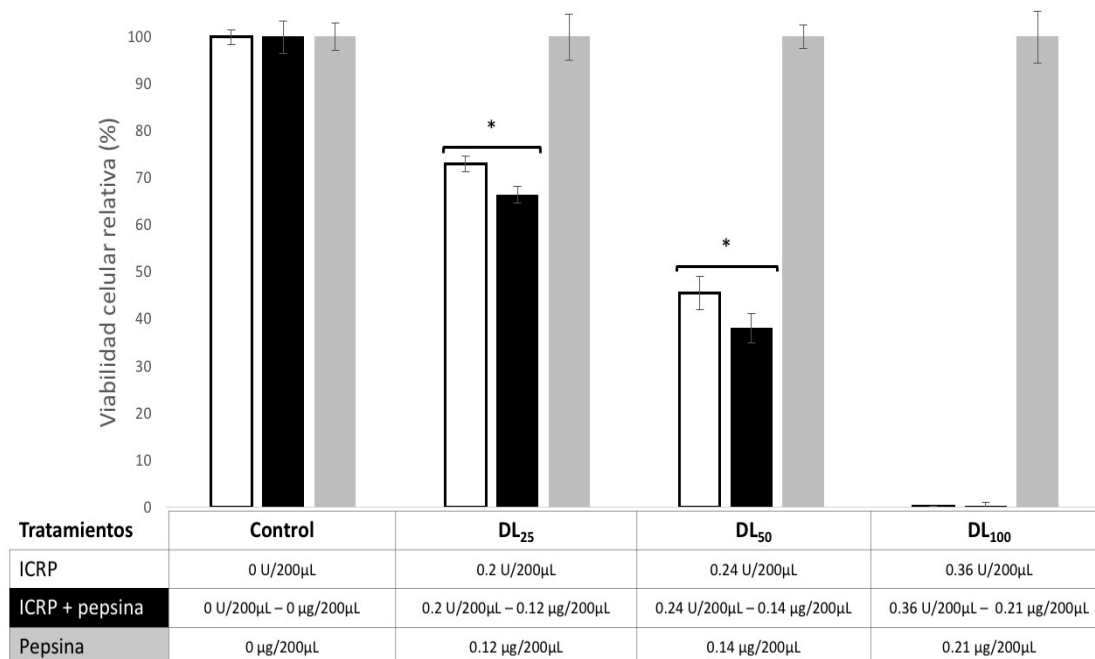


Figura 6. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con pepsina sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con pepsina por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

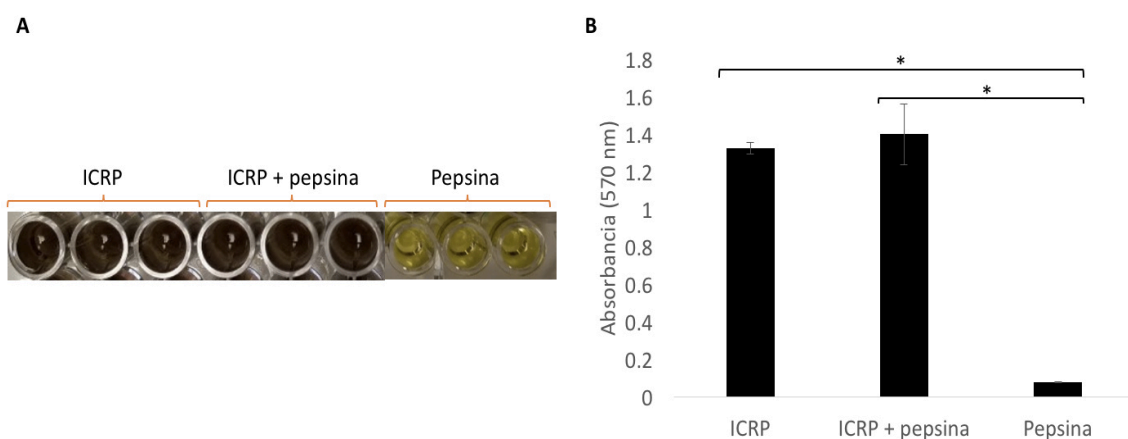


Figura 7. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con pepsina. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con pepsina (0.6 μg/200μL) o pepsina (0.6 μg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

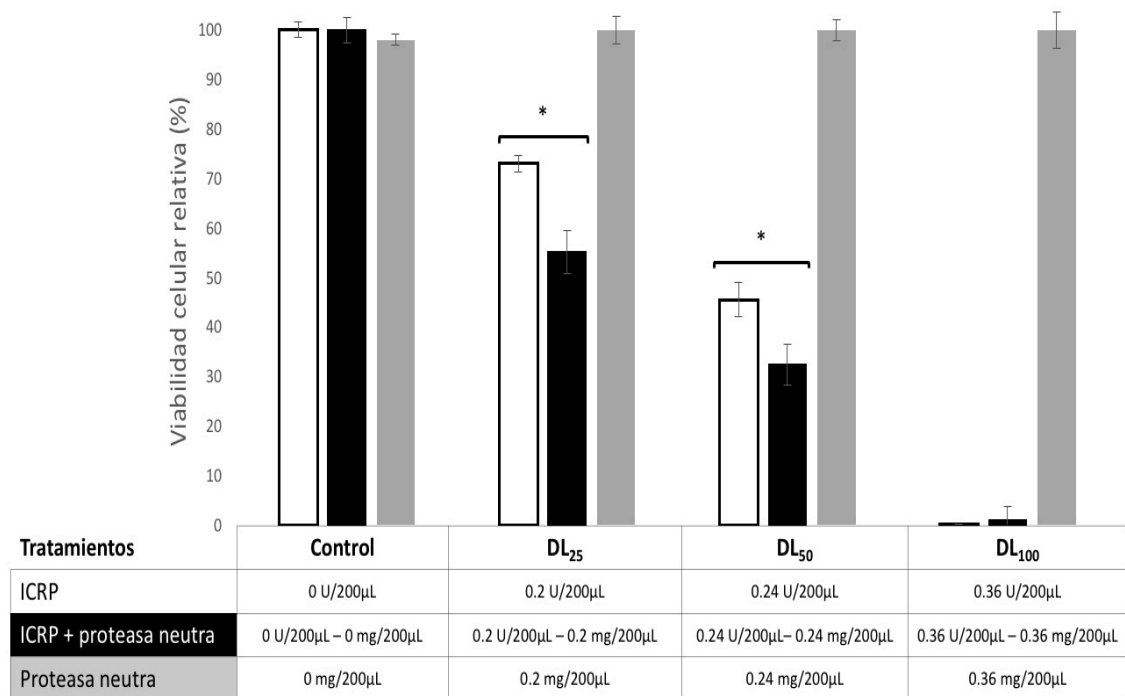


Figura 8. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con proteasa neutra sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con proteasa neutra por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

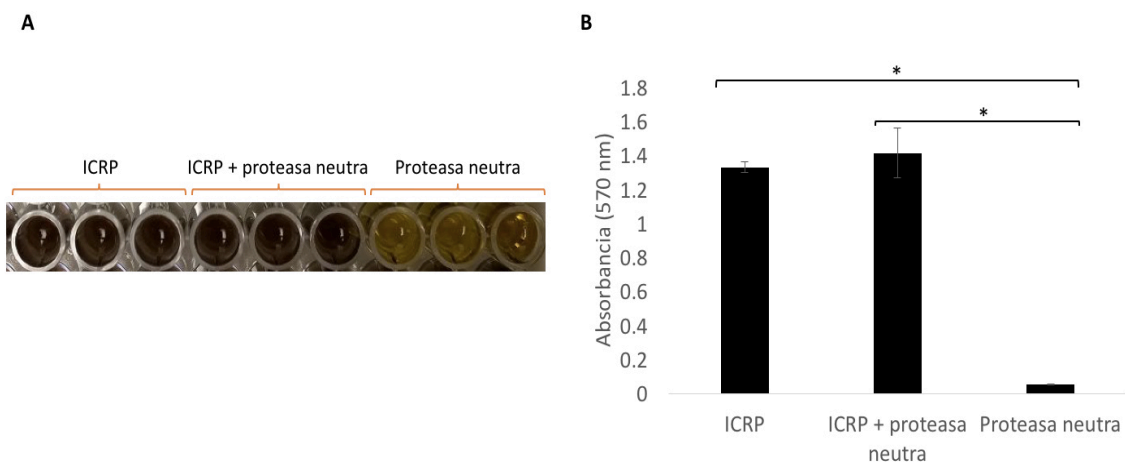


Figura 9. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteasa neutra. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con proteasa neutra (1 mg/200μL) o proteasa neutra (1 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

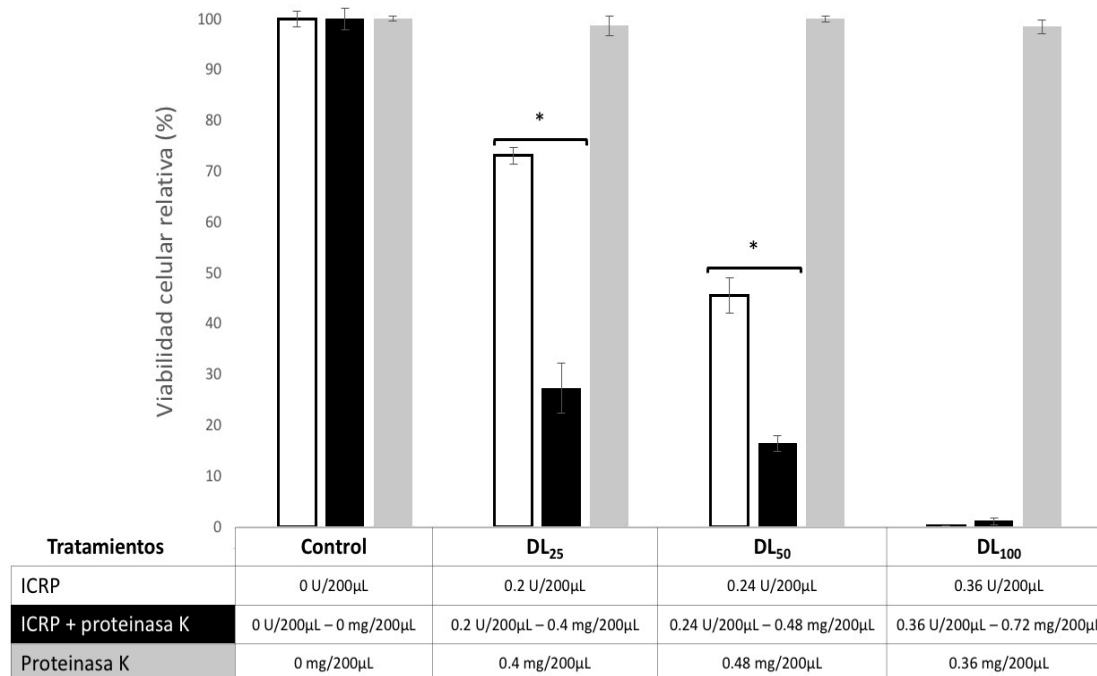


Figura 10. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con proteinasa K sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con proteinasa K por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

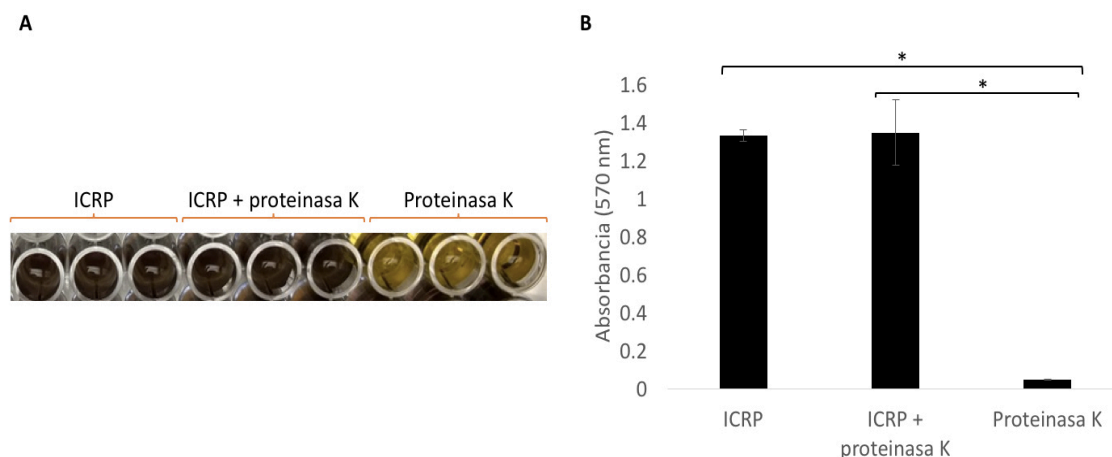


Figura 11. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con proteinasa K. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con proteinasa K (1 mg/200μL) o proteinasa K (1 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

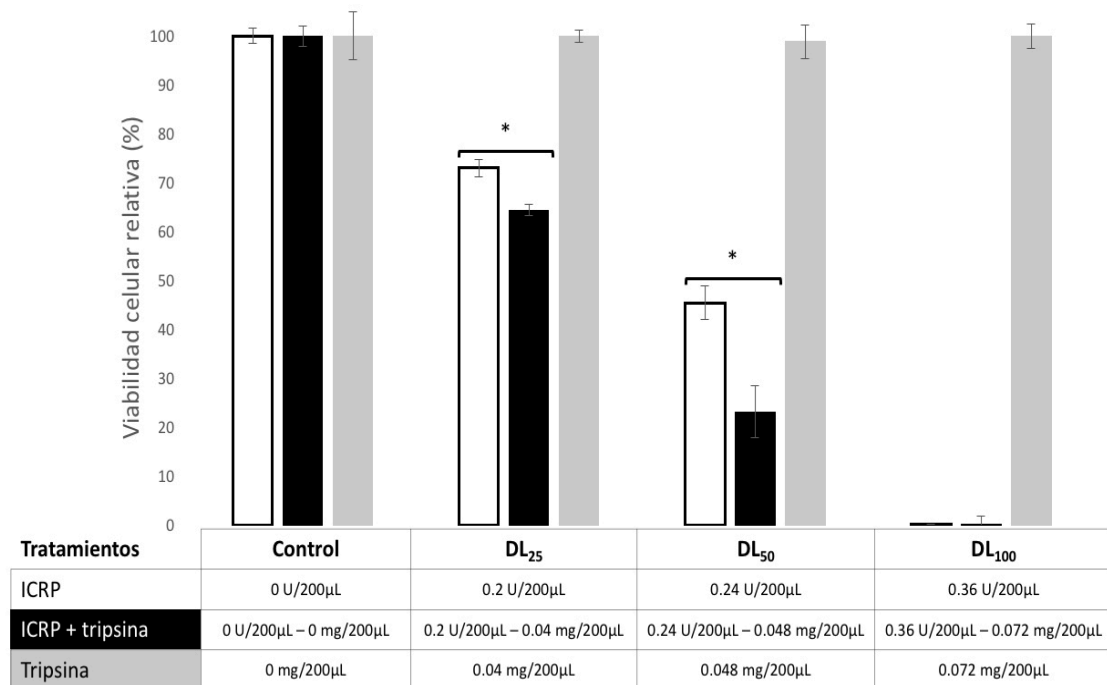


Figura 12. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con tripsina sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con tripsina por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

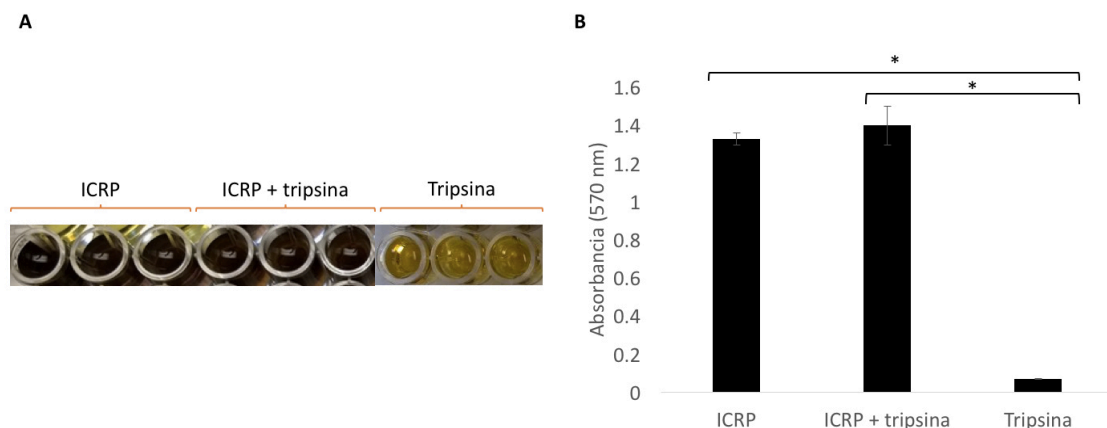


Figura 13. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con tripsina. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con tripsina (0.2 mg/200μL) o tripsina (0.2 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

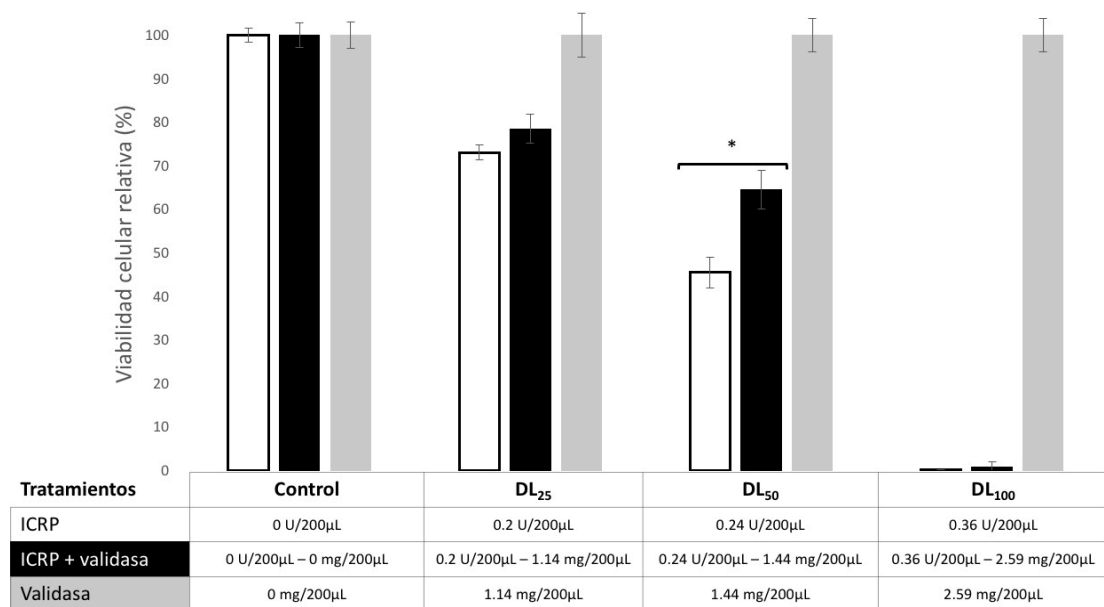


Figura 14. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con validasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con validasa por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

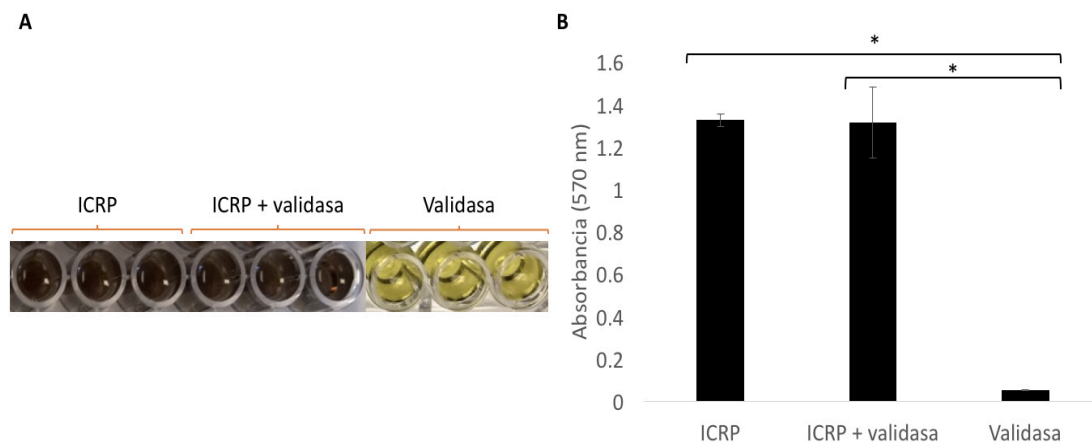


Figura 15. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con validasa. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con validasa (20 mg/200μL) o validasa (20 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

8.5 Determinación de la actividad de las nucleasas.

Se corroboró la actividad de las enzimas desoxirribonucleasa I (DNAsa) y ribonucleasa (RNasa), empleando como sustratos DNA plasmídico y RNA bacteriano, encontrando que la desoxirribonucleasa degradó el DNA plasmídico y la ribonucleasa degradó el RNA bacteriano (Figura 16). Posteriormente se determinó que los tratamientos con DNAsa o con RNasa no afectaron la viabilidad de la línea celular MCF7 (* $p < 0.05$) (Figuras 17 y 19).

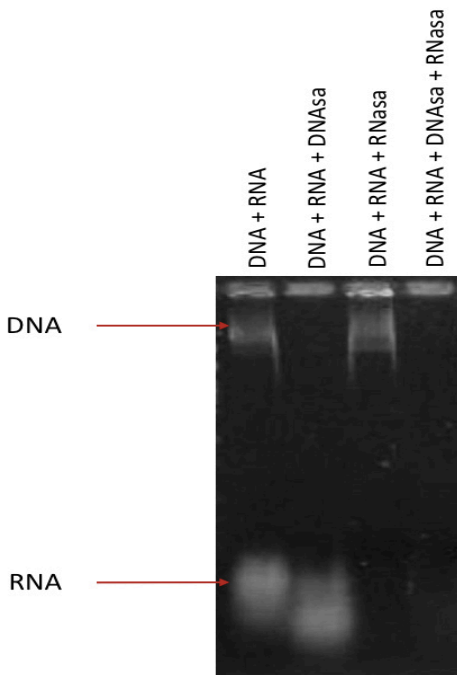


Figura 16. Degradación del DNA plasmídico por la desoxirribonucleasa I y del RNA bacteriano por la ribonucleasa. Se utilizaron como sustratos: DNA plasmídico + RNA bacteriano los cuales fueron tratados con las enzimas DNAsa y RNasa. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa (0.8%) y la tinción con bromuro de etidio (10 µg/mL). La visualización se realizó empleando el fotodocumentador Universal Hood II Electrophoresis Imaging Cabinet (BIO-Rad, Hercules, California, U.S.A.).

8.6 Efecto del tratamiento con nucleasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

Las células MCF7 fueron expuestas a diferentes concentraciones del IMMUNEPOTENT CRP tratado con DNAsa y del IMMUNEPOTENT CRP tratado

con RNasa, encontrando que ambos tratamientos tuvieron un efecto citotóxico dependiente de dosis sobre la viabilidad celular de la línea MCF7 (Figuras 17 y 19). Así mismo, se observó un mayor efecto citotóxico (* $p < 0.05$) tanto del IMMUNEPOTENT CRP tratado con DNAsa (DL₂₅ y DL₅₀) como del IMMUNEPOTENT CRP tratado con RNasa (DL₂₅ y DL₅₀), respecto al IMMUNEPOTENT CRP no tratado (DL₂₅ y DL₅₀). No se encontró diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos cuando se empleó la DL₁₀₀. Posteriormente se determinó que el tratamiento con las nucleasas sobre el IMMUNEPOTENT CRP no afectó de manera significativa (* $p < 0.05$) su actividad antioxidante respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. La DNAsa y la RNasa no indujeron cambios significativos (* $p < 0.05$) en la absorbancia del MTT (Figuras 18 y 20). Por tanto, el efecto biológico del IMMUNEPOTENT CRP se mantiene a pesar del tratamiento con cualquiera de las dos enzimas.

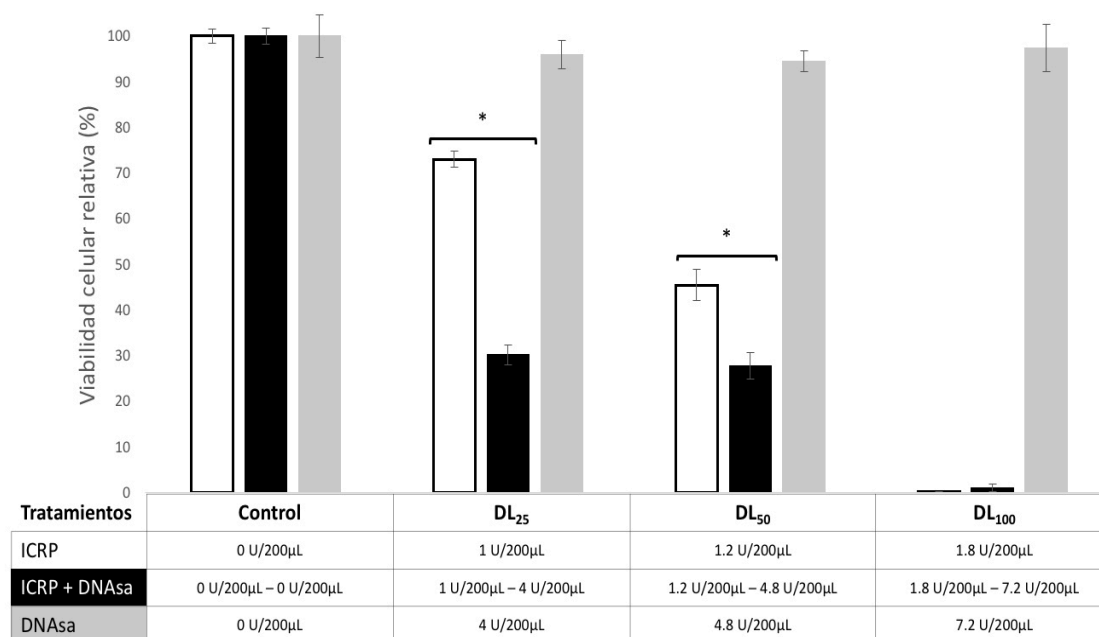


Figura 17. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con desoxirribonucleasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con DNAsa por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

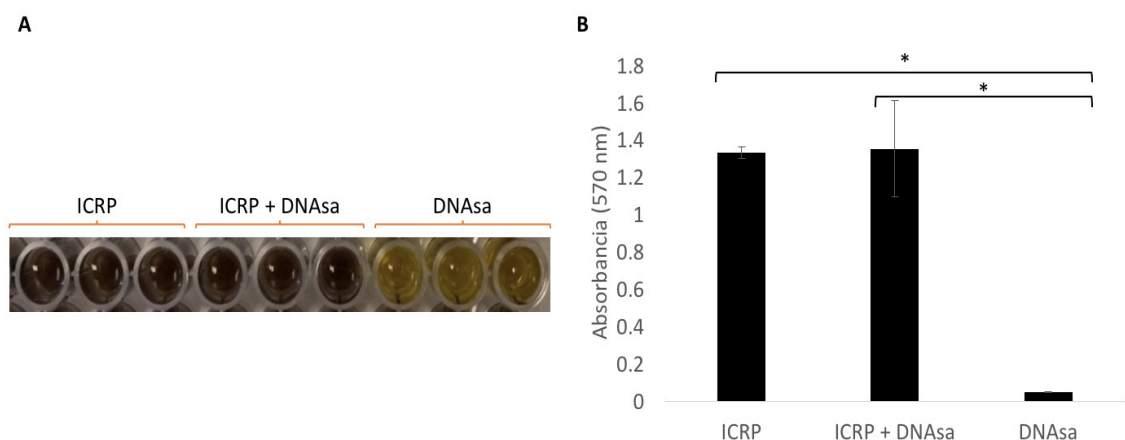


Figura 18. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con desoxirribonucleasa (DNase). En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL /pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μL) tratado con DNase (20 U/200 μL) o DNase (20 U/200 μL); y se adicionaron 100 μL /pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

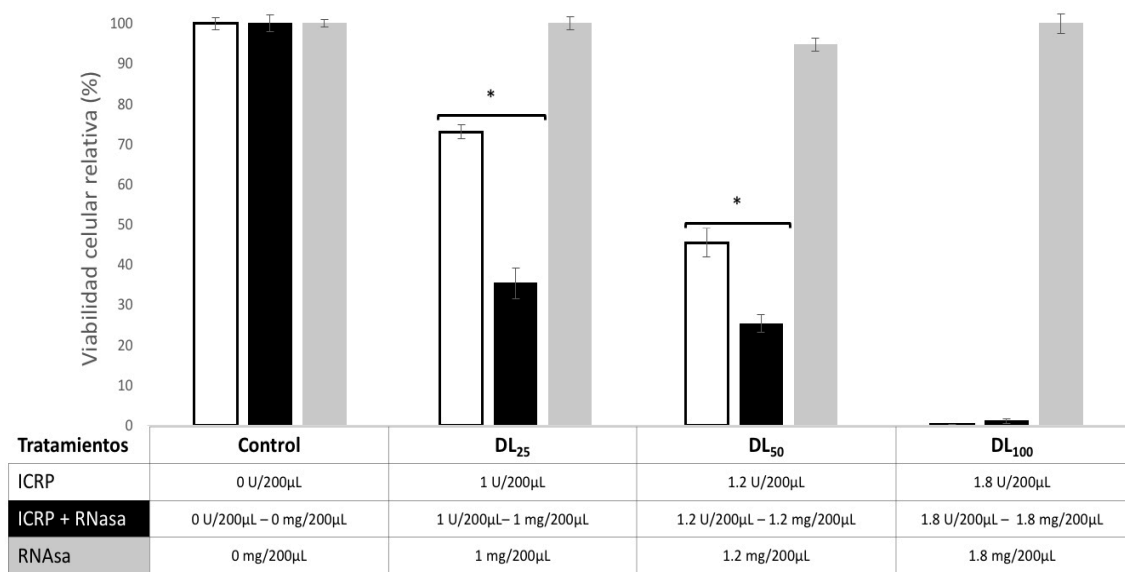


Figura 19. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con ribonucleasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con RNase por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200 μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

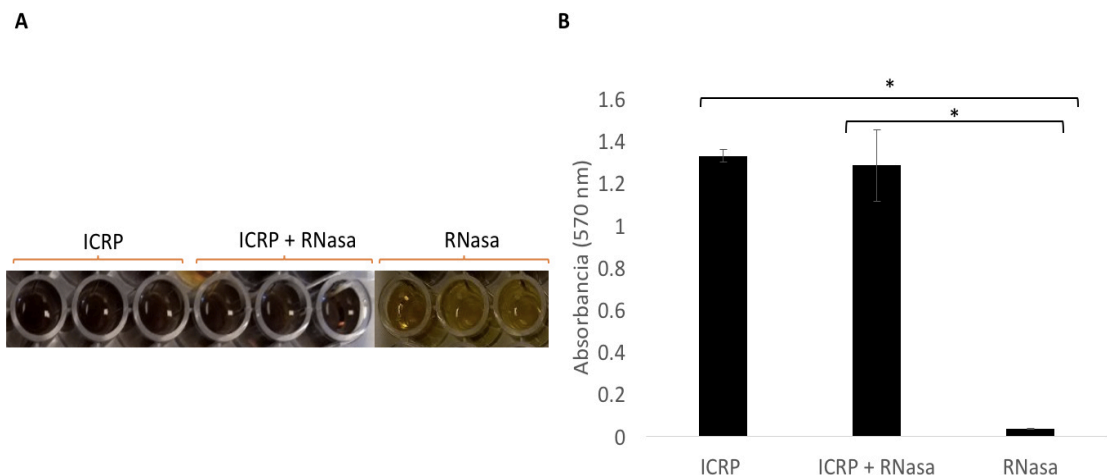


Figura 20. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con ribonucleasa (RNase). En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μ L/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μ L) tratado con RNase (5 μ g/200 μ L) o RNase (5 μ g/200 μ L); y se adicionaron 100 μ L/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

8.7 Determinación de la actividad de α -amilasa y lisozima.

Previamente a la evaluación del efecto del tratamiento con α -amilasa y lisozima sobre el IMMUNEPOTENT CRP, se confirmó la actividad de ambas enzimas sobre un sustrato conocido. En el caso de la α -amilasa, se empleó como sustrato conocido un agar preparado con almidón, el cual fue tratado con la enzima y expuesto a una tinción con lugol. En el agar no tratado con α -amilasa se evidencia la presencia del almidón por el cambio de color característico del lugol (Figura 21C). Por el contrario, el agar con almidón tratado con α -amilasa no cambió de color al ser teñido con lugol, evidenciando la degradación del almidón por la enzima (Figura 21D). Además, el tratamiento con α -amilasa no afectó la viabilidad de la línea celular MCF7 de cáncer de mama (* $p < 0.05$) (Figura 23).

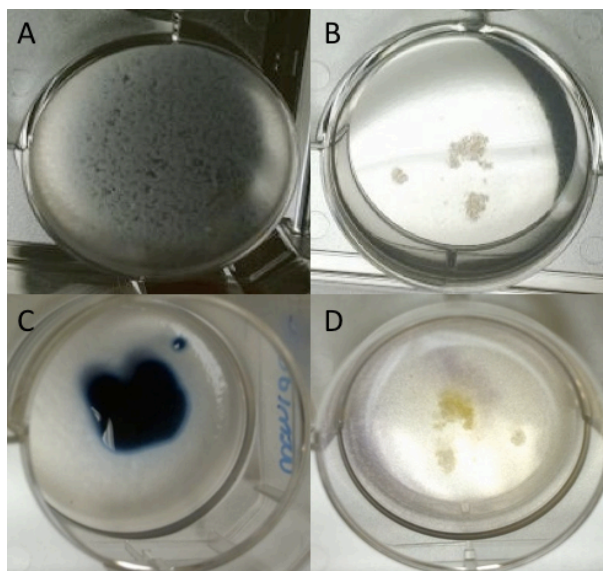


Figura 21. Determinación de la actividad de la α -amilasa sobre un sustrato conocido. Se realizó una preparación de agar (0.15 gr) con almidón (0.1 gr) en 10 mL de agua Milli-Q, tratado y sin tratar con α -amilasa (1mg/mL) (A y B). Ambas placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora y teñidas con lugol (100 μ l) (C y D).

Para determinar la actividad de la lisozima se empleó como sustrato *Micrococcus lysodeikticus*. Se preparó un agar con *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Figura 22A), y se le trató con la enzima. El cambio de turbidez del agar evidencia la degradación del *Micrococcus lysodeikticus* por parte de la enzima (Figura 22B). El tratamiento con lisozima no afectó la viabilidad celular (* $p < 0.05$) de la línea MCF7 de cáncer de mama (Figura 25).

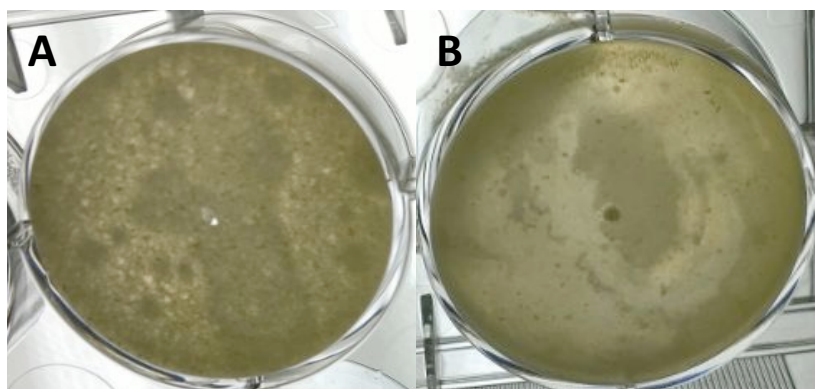


Figura 22. Determinación de la actividad de la lisozima sobre un sustrato conocido. Se realizó una preparación de agar (0.15 gr) con *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (0.1 gr) en 10 mL de agua Milli-Q, sin tratar (A) y tratado con lisozima (0.1mg) (B). Ambas placas fueron incubadas a 37°C por 1 hora.

8.8 Efecto del tratamiento con polisacaridasas sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

El IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa tuvo un efecto citotóxico dependiente de dosis (* $p < 0.05$) sobre la viabilidad celular de la línea MCF7. Además, se observó mayor disminución de la viabilidad (* $p < 0.05$) en las células tratadas con el IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa (DL_{50}), respecto al IMMUNEPOTENT CRP (DL_{50}). No se observaron diferencias (* $p < 0.05$) entre tratamientos a las concentraciones restantes (DL_{25} y DL_{100}) (Figura 23). No hubo diferencia significativa (* $p < 0.05$) en el efecto antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con α -amilasa respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. La α -amilasa no indujo un cambio significativo (* $p < 0.05$) en la absorbancia del MTT (Figura 24).

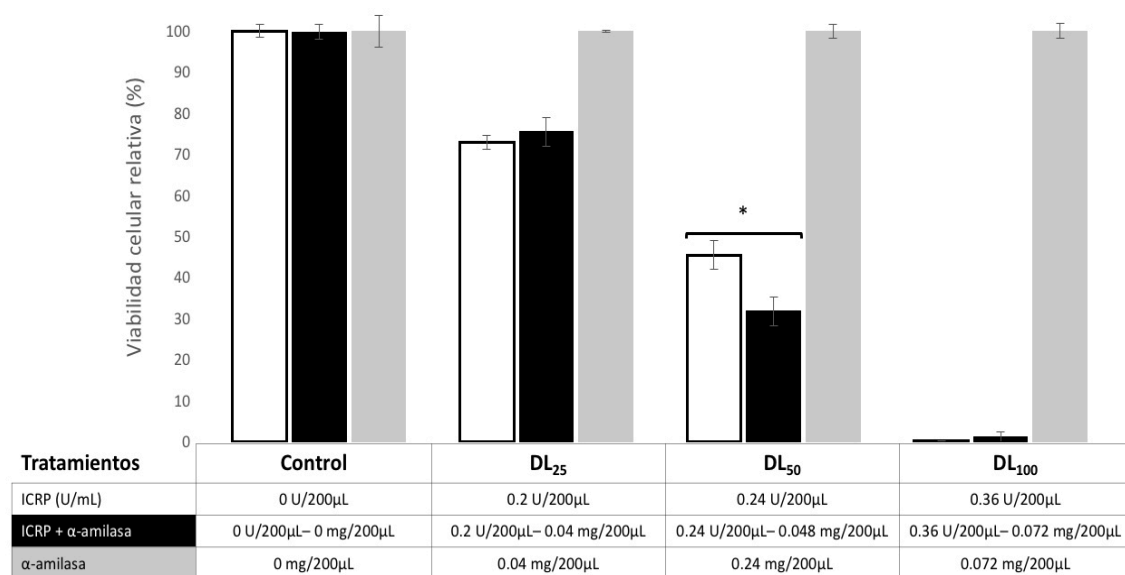


Figura 23. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con α -amilasa sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con α -amilasa por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

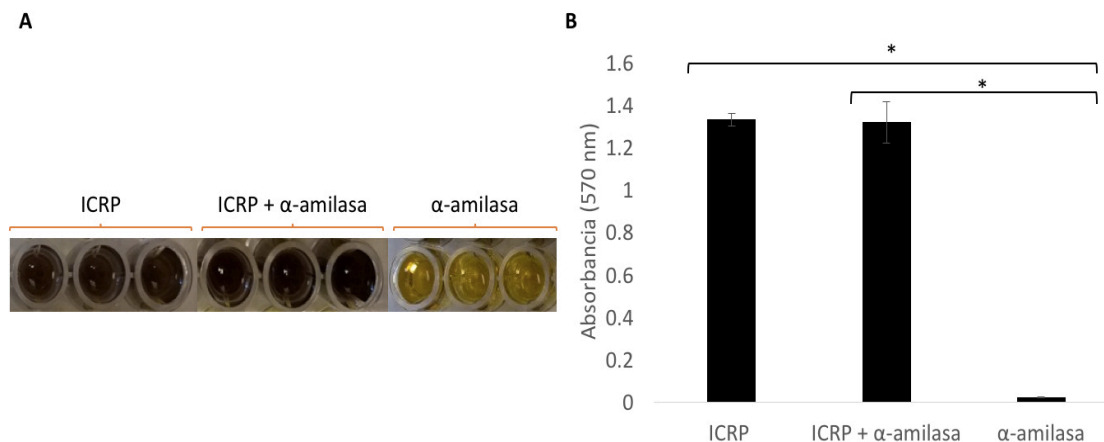


Figura 24. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con α-amilasa. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μ L/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μ L) tratado con α-amilasa (0.2 mg/200 μ L) o α-amilasa (0.2 mg/200 μ L); y se adicionaron 100 μ L/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p<0.05$) entre tratamientos.

El IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima tuvo un efecto citotóxico dependiente de dosis sobre la viabilidad celular de la línea MCF7. Se obtuvo mayor disminución de la viabilidad (* $p<0.05$) con el IMMUNEPOTENT CRP (DL₂₅) en comparación con el IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima (DL₂₅). No hubo diferencia significativa (* $p<0.05$) entre tratamientos con las concentraciones restantes (DL₅₀ y DL₁₀₀) (Figura 25). No se observó diferencia significativa (* $p<0.05$) en la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima, respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratamiento enzimático. Por el contrario, la lisozima no indujo un cambio significativo (* $p<0.05$) en la absorbancia del MTT (Figura 26A y B).

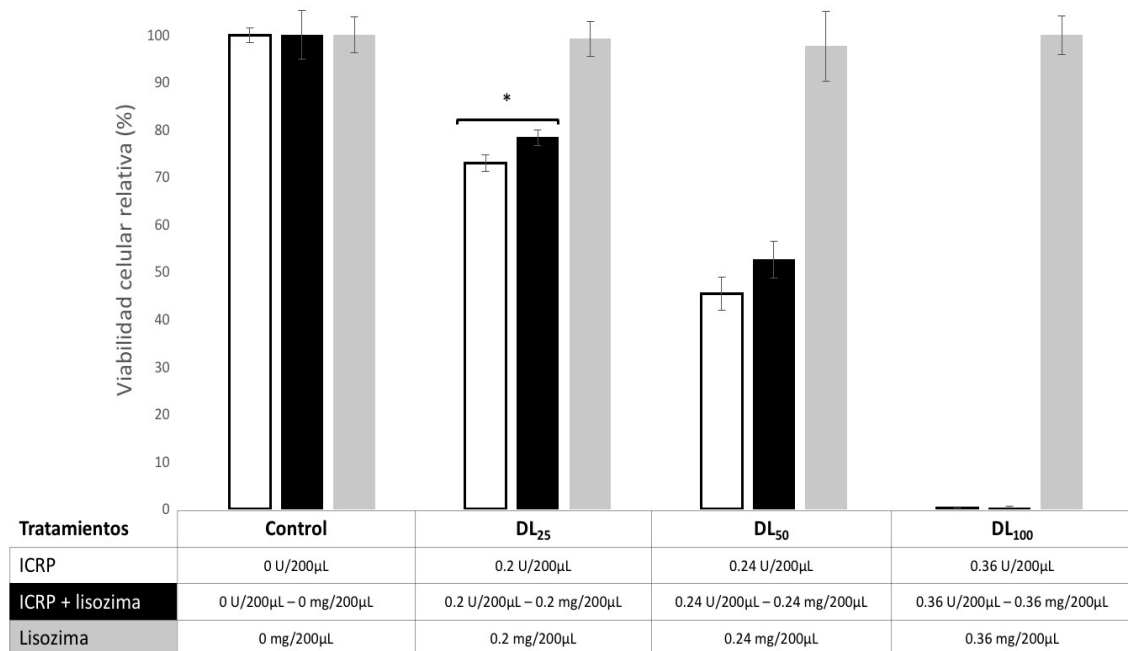


Figura 25. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con lisozima sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con lisozima por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

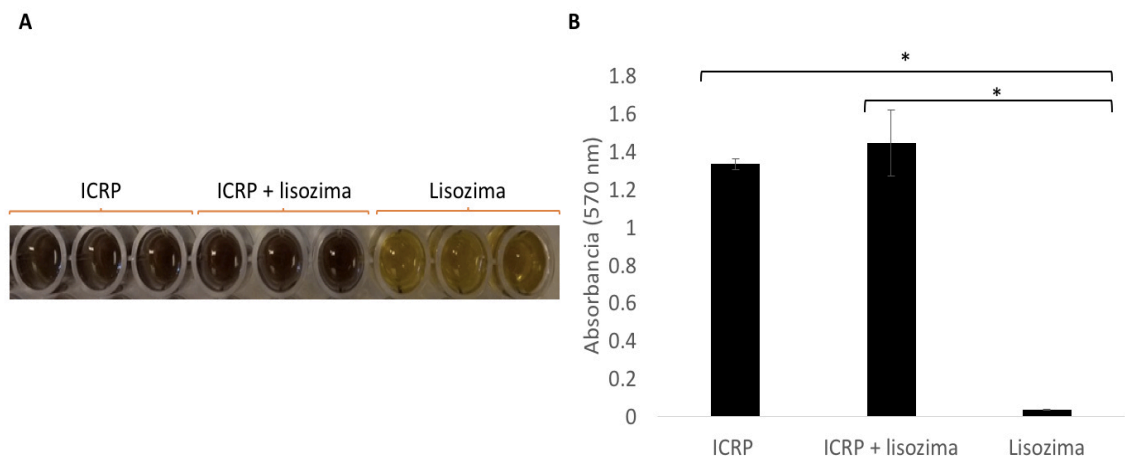


Figura 26. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lisozima. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μL/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200μL) tratado con lisozima (1 mg/200μL) o lisozima (1 mg/200μL); y se adicionaron 100 μL/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

8.9 Determinación de la actividad de la lipasa.

Se confirmó la actividad de la enzima empleando como sustrato agar con emulsiones de aceite (Figura 27A), el cual fue tratado con lipozima (Figura 27B). La degradación de los triacilgliceroles presentes en el agar se evidenció por medio de la tinción con Sudán III del agar no tratado con lipozima (Figura 27C) y tratado con lipozima (Figura 27D). A continuación, se determinó que el tratamiento con lipozima no afectó la viabilidad de la línea celular MCF7 de cáncer de mama (* $p < 0.05$) (Figura 28).

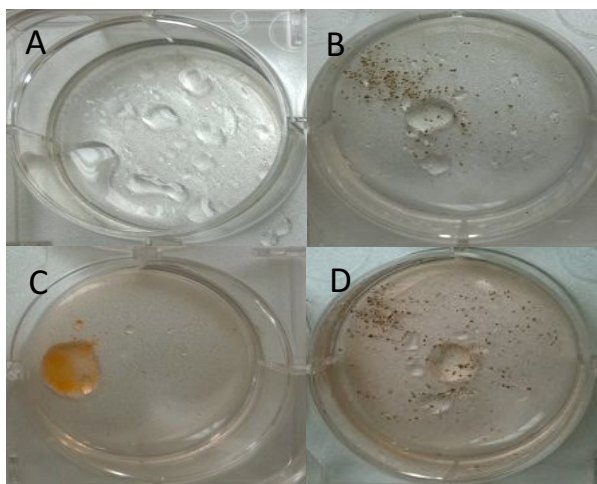


Figura 27. Determinación de la actividad de la lipozima sobre un sustrato conocido. Se realizó una preparación de agar (0.15gr) con aceite (2 mL) en 10 mL de agua Milli-Q, sin tratar y tratado con lipozima (0.1 mg) (A y B, respectivamente). Se incubó por 1 hora a 37°C y se realizó la tinción con Sudán III (1 mL) del agar sin tratar y tratado con lipozima (C y D, respectivamente).

8.10 Efecto del tratamiento con lipasa sobre la actividad antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP.

Finalmente, el tratamiento enzimático con lipozima no afectó la viabilidad celular de la línea MCF7, además el tratamiento del IMMUNEPOTENT CRP con lipozima no inhibió su efecto biológico puesto que se observó disminución dependiente de dosis de la viabilidad celular (* $p < 0.05$). Se encontró mayor efecto citotóxico

(*p<0.05) con el IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima (DL₂₅ y DL₅₀) respecto al IMMUNEPOTENT CRP sin tratar (DL₂₅ y DL₅₀) (Figura 28).

No hubo diferencia significativa (*p<0.05) en la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima respecto al IMMUNEPOTENT CRP; por el contrario, la lipozima no indujo un cambio significativo (*p<0.05) en la absorbancia del MTT (Figura 29A y B).

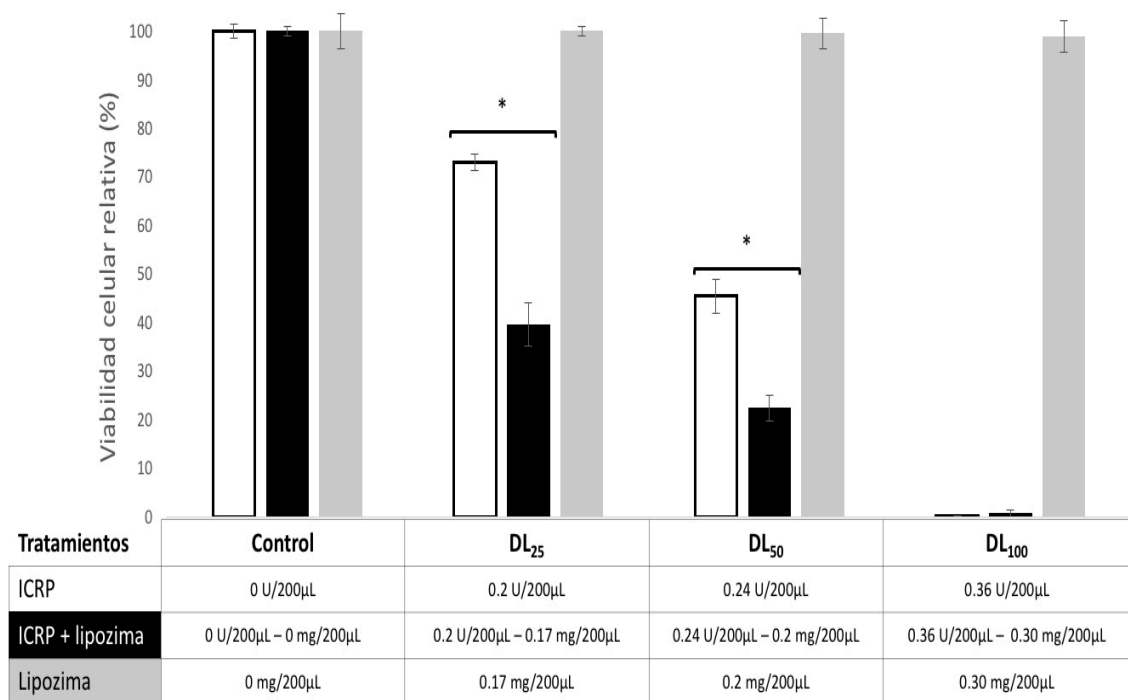


Figura 28. Efecto de IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) tratado con lipozima sobre la viabilidad de la línea celular MCF-7 de cáncer de mama. 5×10^3 células/pozo fueron expuestas a diferentes concentraciones del ICRP tratado con lipozima por 24 horas (0, 0.2, 0.24 y 0.36 U/200μL). La viabilidad celular se determinó por medio del ensayo de resazurina. Los datos son la representación de la media \pm DS de 3 mediciones independientes y los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (*p<0.05) entre tratamientos. Se utilizaron como controles ICRP no expuesto al tratamiento enzimático y tratamiento enzimático solo.

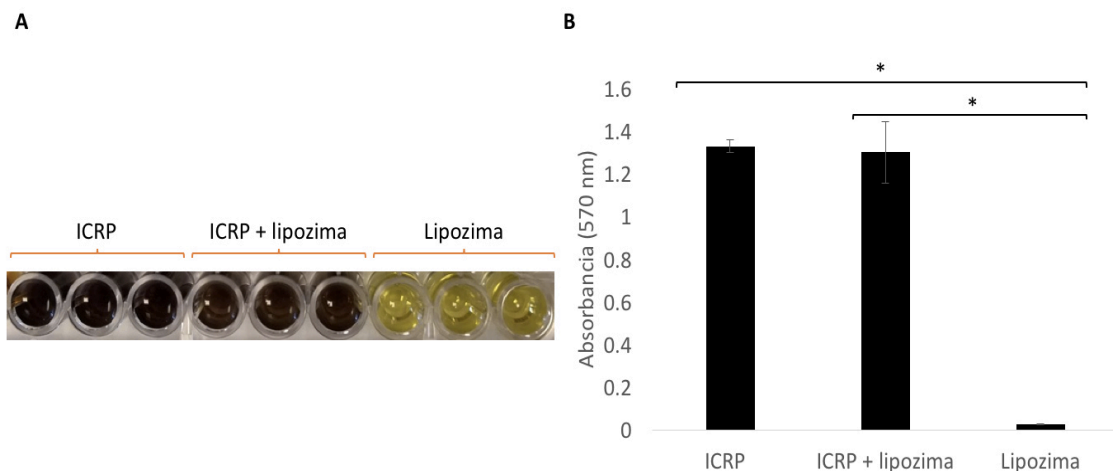


Figura 29. Determinación de la actividad antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tratado con lipozima. En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μ L/pozo del IMMUNEPOTENT CRP, del IMMUNEPOTENT CRP (1 U/200 μ L) tratado con lipozima (0.86 mg/200 μ L) o lipozima (0.86 mg/200 μ L); y se adicionaron 100 μ L/pozo de MTT. La placa se incubó a 37°C por 2 horas (A) y posteriormente se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda 570 nm (B). Los datos están expresados como media \pm DS de 3 mediciones independientes. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

8.11 Actividad antitumoral del IMMUNEPOTENT CRP en un modelo de linfoma murino.

De manera adicional se corroboró la actividad antitumoral *in vivo* del IMMUNEPOTENT CRP sobre un modelo de bolsa de aire modificado con linfoma murino, con la finalidad de administrar volúmenes grandes del IMMUNEPOTENT CRP *in situ*. Los siguientes tratamientos fueron administrados diariamente durante 9 días: PBS (buffer fosfato salino), 5-fluorouracilo (20 mg/kg), IMMUNEPOTENT CRP (3 U) e IMMUNEPOTENT CRP (5 U). Encontrando que en el tratamiento con PBS, empleado como control de crecimiento del tumor, se observó progresión tumoral y dos formas de implantación del tumor en el modelo de bolsa de aire: tumoración adherida a tejido muscular de la región dorsal (Figura 30B); y tumoración subcutánea (Figura 30A y D). Por el contrario, en el grupo tratado con 5-fluorouracilo (20 mg/kg), empleado como control positivo de reducción tumoral, no se observó la presencia de la implantación tumoral en la región muscular (Figura 31A, B y C) con poca presencia tumoral en la región subcutánea (Figura 31B y C). En el caso del IMMUNEPOTENT CRP en dosis de

3 U se observó disminución de la masa tumoral implantada en la región muscular (Figura 32A, B y C) y subcutánea (Figura 32A, B y C) comparada con el tratamiento con PBS. Cuando se administró la dosis de 5 U de IMMUNEPOTENT CRP, se observaron resultados similares a los obtenidos con el 5-fluorouracilo, no observando la presencia de la implantación tumoral en la región muscular (Figura 33A y C), y poca presencia tumoral en la región subcutánea (33B y C). En general las dosis de 3 y 5 U de IMMUNEPOTENT CRP disminuyeron el desarrollo tumoral siendo más efectiva la dosis de 5 U.

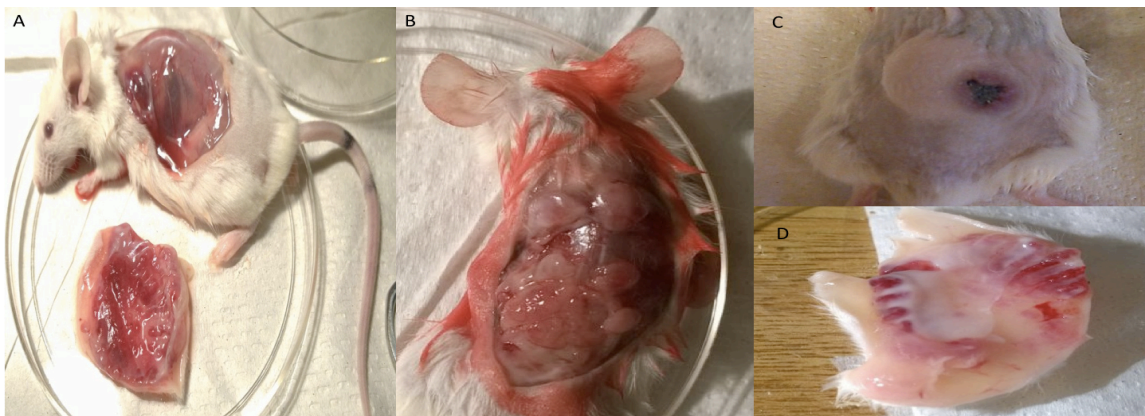


Figura 30. Efecto del tratamiento con PBS en un modelo de linfoma murino. Se inocularon 2×10^6 células L5178YR de linfoma murino de forma subcutánea en el día cero y se les administró PBS (500 μ L) diariamente. Se sacrificaron los ratones el día 9, y se les extrajo la masa tumoral (n=3). (A) tumoración subcutánea. (B) Tumoración subcutánea adherida a tejido muscular de la región dorsal. (C) Lesión externa. (D) Tumoración subcutánea.

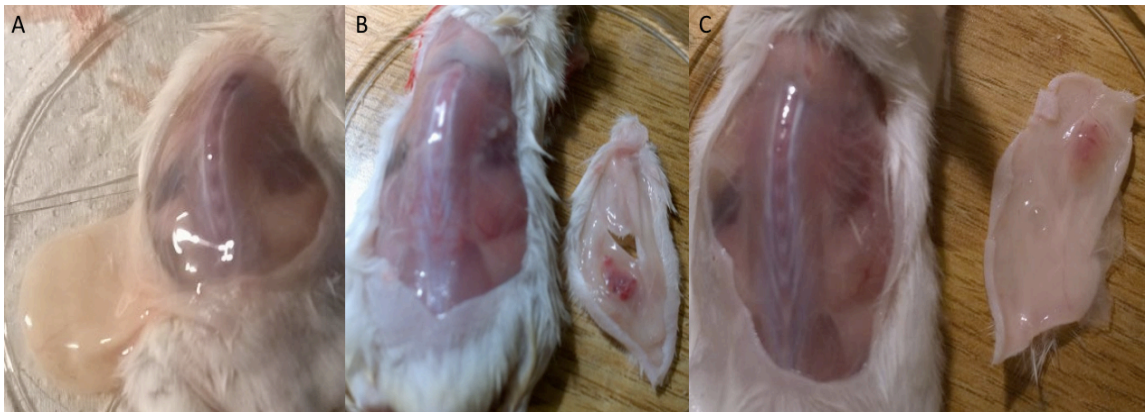


Figura 31. Efecto del tratamiento con 5-fluorouracilo (5-FU) en un modelo de linfoma murino. Se inocularon 2×10^6 células L5178YR de linfoma murino de forma subcutánea en el día cero y se les administró 5-FU (20mg/kg). Se sacrificaron los ratones el día 9, y se les extrajo la masa tumoral (n=3). (A) ausencia de implantación tumoral en la región subcutánea. (B y C) poca presencia tumoral en la región subcutánea.



Figura 32. Efecto del tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) (3 U) en un modelo de linfoma murino. Se inocularon 2×10^6 células L5178YR de linfoma murino de forma subcutánea en el día cero y se les administró ICRP (3 U). Se sacrificaron los ratones el día 9, y se les extrajo la masa tumoral (n=3). (A, B y C) tumoración implantada en la región muscular.



Figura 33. Efecto del tratamiento con IMMUNEPOTENT CRP (ICRP) (5U) en un modelo de linfoma murino. Se inocularon 2×10^6 células L5178YR de linfoma murino de forma subcutánea en el día cero y se les administró ICRP (5U). Se sacrificaron los ratones el día 9, y se les extrajo la masa tumoral (n=3). (A y C) poca presencia tumoral en la región subcutánea. (B) poca presencia tumoral en la región subcutánea con implantación en la región muscular.

También se comparó el peso del tumor (tumores adheridos en tejido subcutáneo y muscular) de los ratones con diferentes tratamientos, no encontrando diferencia significativa entre los tratados con PBS y la dosis de 3 U de IMMUNEPOTENT CRP. Sin embargo, se encontró diferencia significativa (* $p < 0.05$) con los tratamientos de 5-FU y 5 U de IMMUNEPOTENT CRP cuando se compararon con el tratamiento con PBS. Cuando se compararon los tratamientos de IMMUNEPOTENT CRP contra el tratamiento de 5-FU, se encontró diferencia con el tratamiento con 3 U de IMMUNEPOTENT CRP y no se encontró diferencia significativa con el tratamiento con 5 U de IMMUNEPOTENT CRP (* $p < 0.05$) (Figura 34).

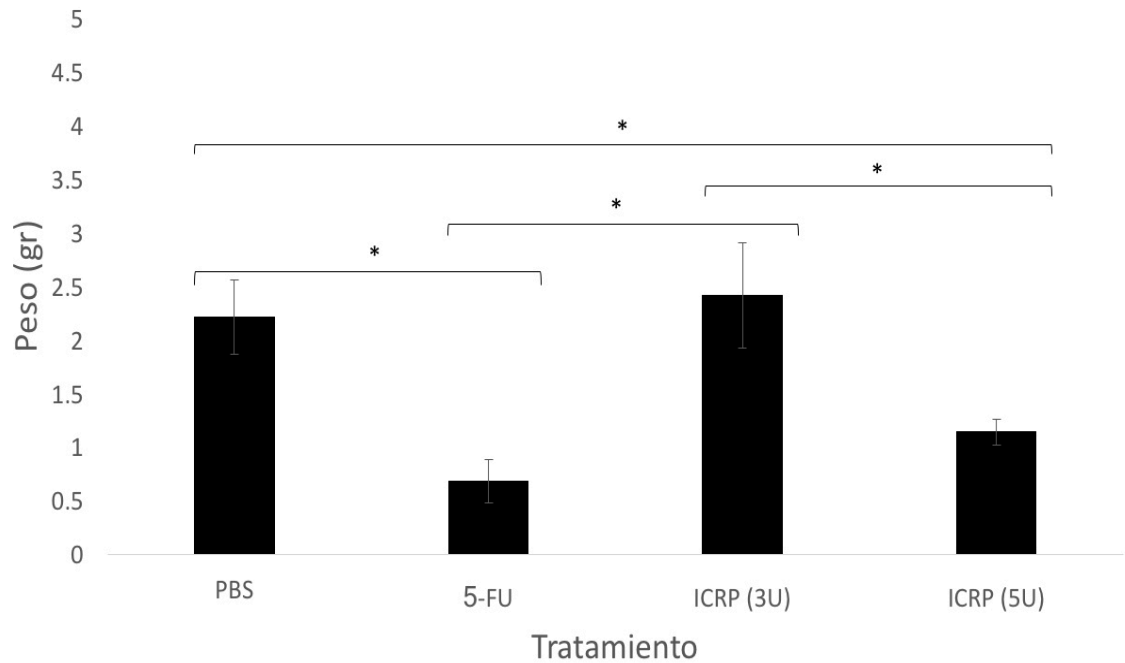


Figura 34. Comparación del peso del tumor de ratones BALB/c con linfoma murino expuestos a diferentes tratamientos. Se pesó el tumor de los ratones expuestos a diferentes tratamientos. Los datos están representados como la media \pm desviación estándar de 3 animales por cada grupo experimental. Los resultados se analizaron por el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una prueba de Tukey para discernir si existe diferencia significativa (* $p < 0.05$) entre tratamientos.

9. Discusión

El extracto dializable de células de bazo de bovino (IMMUNEPOTENT CRP) es un biocompuesto que consiste de una mezcla de péptidos y sustancias como carbohidratos, lípidos y sus combinaciones con un peso aproximado de 12-14 kDa, liberados por medio del rompimiento de las células de bazo de bovinos sanos obtenidos de rastros tipo TIF (Tipo Inspección Federal). Se ha reportado que su administración como adyuvante en la enfermedad mejora la respuesta clínica de pacientes con alergias, infecciones y pacientes tratados con quimioterapia (Franco-Molina *et al.* 2008, 2004). Este efecto está asociado a su capacidad para modular la respuesta inmune afectando vías de señalización como el NF- κ B y antioxidantes, así como la producción de citocinas (Franco-Molina *et al.* 2005). Además de sus actividades relacionadas a la de protección de médula ósea en pacientes con tratamiento quimioterapéutico (Coronado-Cerda *et al.* 2016), inducción de muerte inmunogénica en melanoma (Rodríguez-Salazar *et al.* 2017) y efecto antitumoral *in vitro* e *in vivo* sobre diferentes líneas celulares de cáncer (Franco-Molina *et al.* 2010, 2006).

El IMMUNEPOTENT CRP es un producto patentado que cuenta con marca registrada ante el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual) el cual es elaborado bajo buenas prácticas de manufactura. Como parte de su explotación comercial por vía oral y a la falta de estudios relacionados al efecto que puedan ejercer las enzimas digestivas cuando sea administrado por esta vía el presente trabajo de investigación se enfoca en discernir si las actividades antitumoral y antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP tienen la capacidad de resistir la actividad enzimática.

De acuerdo con Shire (2009), los cambios de condiciones a los que se somete todo compuesto biológico una vez administrado por vía oral o parenteral, alteran sus propiedades físicas y químicas pudiendo afectar su efectividad. Por

ende, la formulación de todo compuesto biológico debe ser optimizada, tomando en cuenta su vía de administración, siendo la oral la más favorable (Shire 2009).

El efecto beneficioso de un biocompuesto depende de su capacidad para alcanzar intacto los órganos donde va a realizar su función. Sin embargo, una vez en el organismo dicho compuesto debe atravesar una serie de barreras potenciales que pueden inactivarlo o potenciarlo. Las enzimas digestivas, la absorción a través del tracto gastrointestinal y las proteasas sanguíneas pueden producir la hidrólisis de los mismos y generar fragmentos inactivos o con una actividad mayor que su secuencia precursora (Segura-Campos *et al.* 2010).

Una de las pruebas empleadas para determinar la calidad del lote de producción del IMMUNEPOTENT CRP es su efecto antitumoral sobre la línea MCF7. Por lo que en el presente estudio se evaluó dicha actividad biológica, encontrando que el IMMUNEPOTENT CRP induce disminución dependiente de dosis de la viabilidad celular de la línea MCF7; estos datos concuerdan con lo reportado previamente por Franco-Molina *et al.* (2006) en donde se comprobó el efecto citotóxico del IMMUNEPOTENT CRP sobre diversas líneas celulares de cáncer de mama (Franco-Molina *et al.* 2006).

Previamente se demostró la actividad enzimática de las enzimas empleadas en este estudio, sobre un sustrato conocido las cuales fueron inactivadas a las enzimas por medio de calor (100°C) para que no afectaran la viabilidad celular, ya que la actividad enzimática afecta la viabilidad celular de una manera dependiente de tiempo, tal como reporta Seaman *et al* (2015) (Seaman *et al.* 2015). Con esto se corroboró que el método de inactivación es efectivo, ya que no se afectó la viabilidad de las células MCF7.

Burger (1979) sugiere que el extracto dializable de leucocitos conteniendo factor de transferencia debe ser sometido a ensayos de sensibilidad enzimática para determinar si su actividad biológica es inhibida o potenciada (Burger *et al.* 1979). Por lo que bajo este marco regulatorio el IMMUNEPOTENT CRP fue expuesto de forma independiente a la actividad de diferentes enzimas durante 24 h; posteriormente las enzimas fueron inactivadas con calor a 100°C. Concluyendo que la actividad enzimática no inhibe el efecto antitumoral *in vitro* del IMMUNEPOTENT CRP sobre la línea MCF7, sugiriendo que nuestro compuesto es capaz de resistir la degradación por parte de las enzimas con las que fue tratado. Es importante mencionar que la actividad del IMMUNEPOTENT CRP no se afecta por la exposición a altas temperaturas (100°C), ni por bajos niveles de pH (2.0), concordando en parte con los resultados obtenidos por Fernanda Cervantes (Cervantes Wong, 2017). De acuerdo con Dressler y Rosenfeld (1974) la resistencia de la actividad biológica a la degradación con enzimas, tales como proteasas y ribonucleasas, entre otras, no implica que estas biomoléculas estén ausentes en el extracto, sino que probablemente la heterogeneidad de la mezcla les confiere protección a todos sus componentes al no encontrarse expuestos en un estado puro (Dressler y Rosenfeld 1974).

En algunos casos el IMMUNEPOTENT CRP (DL₂₅ o DL₅₀) expuesto al efecto de collagenasa, pepsina, proteasa neutra, proteinasa K, tripsina, DNasa, RNasa, α-amilasa o lipozima, incrementó significativamente su efecto citotóxico al compararse con el IMMUNEPOTENT CRP no expuesto a enzimas. Por el contrario, a estas mismas dosis el IMMUNEPOTENT CRP expuesto a validasa o a lisozima, disminuyó su efecto citotóxico. Estos resultados son contradictorios con lo encontrado con las DL₁₀₀ del IMMUNEPOTENT CRP, en donde la viabilidad celular fue afectada significativamente no encontrando diferencias entre tratamientos.

Durante el proceso natural de digestión, las enzimas hidrolíticas gastrointestinales pueden inactivar biomoléculas o liberar fragmentos de éstas, los cuales se encontraban inactivos en su sitio de origen, presentando propiedades especiales una vez liberados. Por lo tanto, para que biomoléculas, tales como péptidos, sean utilizados como nutraceuticos y ejerzan un efecto fisiológico *in vivo* después de su administración oral, es de crucial importancia que permanezcan activos durante la digestión y absorción gastrointestinal para que puedan alcanzar el sistema cardiovascular. Los principales factores que afectan la absorción oral de los péptidos son las diferencias metabólicas, anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del tracto gastrointestinal, la actividad enzimática del mismo, la pobre permeabilidad de los biopéptidos al cruzar las membranas biológicas, así como su naturaleza hidrofílica y tamaño molecular. No obstante, algunos fragmentos son parcialmente resistentes a los procesos de hidrólisis y son susceptibles de ser absorbidos en cantidades fisiológicamente activas y alcanzar intactos la circulación sanguínea (Gavhane y Yadav 2012).

Por otra parte, se determinó que el IMMUNEPOTENT CRP tiene actividad antitumoral *in vivo*, reduciendo la masa tumoral dependiendo de la dosis empleada. Además, determinamos que, en el modelo de bolsa de aire del tumor, se pueden administrar 3 y 5 U de IMMUNEPOTENT CRP empleando una cantidad de fluidos mayor (500 µl) debido a que existe un mayor espacio de administración sin generar efectos secundarios relacionados a la administración de la de 3 y 5 U en un volumen de 200 µl en ratones (dolor neurogénico, falta de movilidad y muerte). Aunque el modelo de bolsa de aire es empleado en estudios relacionados a inflamación (Duarte *et al.* 2016), nosotros lo modificamos pretendiendo simular un efecto parecido a la caja de cultivo y observar el efecto de nuestro compuesto sobre el tumor. Una observación importante que logramos apreciar en este modelo, es que el grado de absorción del IMMUNEPOTENT CRP es rápido, ocurre aproximadamente en 5 a 10

minutos, lo que nos indica que se podrían obtener mejor efecto antitumoral con una formulación de liberación prolongada.

Nosotros somos los primeros en implementar este modelo y determinamos su eficacia sugiriendo su empleo en la evaluación tumoral en donde se tengan que administrar volúmenes grandes y en repetidas ocasiones sin tener efectos secundarios derivados de la administración cuando se emplean sustancias que inducen alto nivel de dolor.

También se evaluó la actividad antioxidante del IMMUNPOTENT CRP, encontrando que el IMMUNEPOTENT CRP (1 U) reduce el reactivo MTT al compuesto formazán. Estos datos concuerdan con lo reportado por Franco-Molina (2011) quien determinó que el IMMUNEPOTENT CRP disminuye el estrés oxidativo de macrófagos humanos estimulados con lipopolisacáridos (Franco-Molina *et al.* 2011).

Posteriormente se determinó como prueba de potencia la evaluación antioxidante del IMMUNEPOTENT CRP cuando es expuesto a tratamientos enzimáticos, concluyendo que la actividad enzimática no inhibe el efecto antioxidante *in vitro* del IMMUNEPOTENT CRP sugiriendo que nuestro compuesto es capaz de resistir la degradación por parte de las enzimas con las que fue tratado. Esto concuerda con lo observado por Han (2014) quien demostró en un estudio previo que péptidos derivados de bazo porcino hidrolizado mediante una proteasa, conservan su actividad antioxidante tanto *in vitro* como *in vivo*, habiendo sido administrados de forma oral (Han *et al.* 2014).

En conclusión, nuestros resultados demuestran que las actividades biológicas evaluadas (efecto antitumoral y antioxidante) del IMMUNEPOTENT CRP, son resistentes a la degradación enzimática, calor y cambios de pH; sugiriendo que pueden ser administrados por diferentes rutas de administración (incluidas la oral y la parenteral), sin perder su eficacia, evitando la necesidad de modificar nuestro proceso de formulación para prevenir degradación. Además, de sugerir

que la prueba de viabilidad celular en la línea MCF7 y la actividad antioxidante pueden ser empleadas como pruebas de potencia para la liberación de lotes de producción del IMMUNEPOTENT CRP.

10. Conclusión

El IMMUNEPOTENT CRP mantiene su actividad antitumoral y su actividad antioxidante independientemente del tratamiento enzimático empleado (proteasas, nucleasas, polisacaridasas y lipasa), calor y pH.

La actividad antitumoral y la actividad antioxidante son parámetros útiles para determinar si el lote de producción del IMMUNEPOTENT CRP es apto para su liberación.

El IMMUNEPOTENT CRP afecta el crecimiento tumoral *in vivo*.

11. Perspectivas

En base a lo encontrado en este trabajo consideramos adecuado establecer un sistema de formulación dirigido a resolver el proceso de liberación para que el producto ejerza su efecto de una manera sostenida en caso de que se requiera su administración por vía parenteral.

Por otra parte, debido a que el modelo de bolsa de aire permite la administración de mayores volúmenes del IMMUNEPOTENT CRP, sin daño aparente al animal, sugerimos incrementar la dosis empleada en este trabajo para mejorar su efectividad antitumoral.

12. Literatura citada

- 1) Aqvist SE, Anfinsen CB. 1959. The Isolation and Characterization of Ribonucleases from Sheep Pancreas. *The Journal of Biological Chemistry* 5: 1112–17.
- 2) Azevedo HS, Reis RL. 2004. Understanding the Enzymatic Degradation of Biodegradable Polymers and Strategies to Control Their Degradation Rate. *Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. CRC Press. pp: 177-197.
- 3) Baram P, Mosko M. 1962. Chromatography of the Human Tuberculin Delayed-Type Hypersensitivity Transfer Factor. *The Journal of Allergy* 33 (12): 498–506.
- 4) Baram P, Yuan L, Mosko MM. 1966. Studies on the Transfer of Human Delayed-Type Hypersensitivity. Partial Purification and Characterization of Two Active Components. *Journal of Immunology* 97(3): 407–20.
- 5) Barman TE. 1969. *Enzyme Handbook*. Vol. I. Springer Berlin Heidelberg. pp: 21-499.
- 6) Bisswanger H. 2014. Enzyme Assays. *Perspectives in Science* 1 (1-6): 41–55. doi:10.1016/j.pisc.2014.02.005.
- 7) Blankenstein T, Coulie PG, Gilboa E, Jaffee EM. 2012. The determinants of tumour immunogenicity. *Nature Reviews Cancer*. 12(4): 307-313.
- 8) Burger D, Vandenbark AA, Dunnick W, Kraybill W, Doyle Daves G, Vetto RM. 1979. Human Transfer Factor: Structural Properties Suggested by

HPRP Chromatography and Enzymatic Sensitivities. *The Journal of Immunology* 122 (3): 1091.

- 9) Cal S, Tan KL, McGregor A, Connolly BA. 1998. Conversion of bovine pancreatic DNase I to a repair endonuclease with a high selectivity for abasic sites. *The EMBO Journal* 17 (23): 7128–38. doi:10.1093/emboj/17.23.7128.
- 10)Cervantes Wong, Maria Fernanda. 2017. Nuevo método de obtención del extracto dializable de leucocitos de bovino y validación de su actividad antitumoral y anti-inflamatoria *in vitro*. San Nicolás de los Garza, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- 11)Coronado-Cerda EE, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Prado-García H, Rivera-Morales LG, Zapata-Benavides P, Rodríguez-Salazar MC, Caballero-Hernández D, Tamez-Guerra RS y Rodríguez-Padilla C. 2016. *In Vivo* Chemoprotective Activity of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract in Mouse Bone Marrow Cells against Damage Induced by 5-Fluorouracil. *Journal of Immunology Research* 2016: 1–10. doi:10.1155/2016/6942321.
- 12)Cunningham LW. 1954. Molecular-Kinetic Properties of Crystalline Diisopropyl Phosphoryl Trypsin. *Journal of Biological Chemistry* 211 (1): 13–19.
- 13)Dressler D y Rosenfeld S. 1974. On the Chemical Nature of Transfer Factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (11): 4429–34.

- 14)** Duarte DB, Vasko MR, Fehrenbacher JC. 2016. Models of Inflammation: Carrageenan Air Pouch. *Current Protocols in Pharmacology* 72 (marzo): 5.6.1–9. doi:10.1002/0471141755.ph0506s72.

- 15)** Ebeling W, Hennrich N, Klockow M, Metz H, Dieter Orth H, Hermann L. 1974. Proteinase K from *Tritirachium Album Limber*. *European Journal of Biochemistry* 47 (1): 91–97. doi:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03671.x.

- 16)** Farmer P, Frenk J, Knaul FM, Shulman LN, Alleyne G, Armstrong L, et al. 2010. Expansion of cancer care and control in countries of low and middle income: a call to action. *The Lancet*. 376: 1186-1193.

- 17)** Franciosi S, De Gasperi R, Dickstein DL, English DF, Rocher AB, William J, Christoffel D, et al. 2007. Pepsin Pretreatment Allows Collagen IV Immunostaining of Blood Vessels in Adult Mouse Brain. *Journal of neuroscience methods* 163 (1): 76–82. doi:10.1016/j.jneumeth.2007.02.020.

- 18)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández DF, Sierra-Rivera CA, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Tamez-Guerra MS, Rodríguez-Padilla C. 2011. Anti-inflammatory and antioxidant effects of IMMUNEPOTENT CRP in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human macrophages. *African Journal of Microbiology Research* 5(22): 3726-3736. DOI: 10.5897/AJMR11.578.

- 19)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Miranda-Hernández D, Zapata-Benavides P, Castillo-León L, Isaza-Brando C, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2006. *In Vitro* Effects of Bovine Dialyzable Leukocyte Extract (bDLE) in Cancer Cells. *Cytotherapy* 8 (4): 408–14. doi:10.1080/14653240600847266.

- 20)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Vera-García ME, Castillo-Tello P, García de la Fuente A, Mendoza RD, Garza RG, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2008. "MMUNEPOTENT CRP (bovine Dialyzable Leukocyte Extract) Adjuvant Immunotherapy: A Phase I Study in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Cytotherapy* 10 (5): 490–96. doi:10.1080/14653240802165681.
- 21)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2004. Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Protects against LPS-Induced, Murine Endotoxic Shock. *International Immunopharmacology* 4 (13): 1577–86. doi:10.1016/j.intimp.2004.06.014.
- 22)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Castillo-León L, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2005. "Bovine Dialyzable Leukocyte Extract Modulates the Nitric Oxide and Pro-Inflammatory Cytokine Production in Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Peritoneal Macrophages In Vitro". *Journal of Medicinal Food* 8 (1): 20–26. doi:10.1089/jmf.2005.8.20.
- 23)** Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Castillo-Tello P, Isaza-Brando CE, Zamora-Avila D, Rivera-Morales LG, et al. 2010. Antiangiogenic and antitumor effects of IMMUNEPOTENT CRP in murine melanoma. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 32 (4): 637–46. doi:10.3109/08923971003663253.
- 24)** Fudenberg HH. 1976. DIALYZABLE TRANSFER FACTOR IN THE TREATMENT OF HUMAN OSTEOSARCOMA: AN ANALYTIC REVIEW. *Annals of the New York Academy of Sciences* 277 (1 International): 545–57. doi:10.1111/j.1749-6632.1976.tb41729.x.

- 25)** Fudenberg HH. 1989. Transfer Factor: Past, Present and Future. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 29 (1): 475–516. doi:10.1146/annurev.pa.29.040189.002355.
- 26)** Furihata C, Saito D, Fujiki H, Kanai Y, Matsushima Y, Sugimura T. 1980. Purification and Characterization of Pepsinogens and a Unique Pepsin from Rat Stomach. *European Journal of Biochemistry* 105 (1): 43–50.
- 27)** Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo JM, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, Bloy N. 2014. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget*. 5(24): 12472-12508.
- 28)** Gaspar EB, Sakai YI, De Gaspari E. 2014. A mouse air pouch model for evaluating the immune response to *Taenia crassiceps* infection. *Experimental Parasitology* 137: 66–73.
- 29)** Gavhane YN, Yadav AV. 2012. Loss of Orally Administered Drugs in GI Tract. *Saudi Pharmaceutical Journal* 20 (4): 331–44. doi:10.1016/j.jsps.2012.03.005.
- 30)** Griffin PJ, Fogarty WM. 1973. Physiochemical Properties of the Native, Zinc- and Manganese-Prepared Metalloprotease of *Bacillus Polymyxa*. *Applied Microbiology* 26 (2): 191–95.
- 31)** Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 32)** Karhumäki E, Marnela KM, Krohn K. 1988. Chromatographic and enzymatic effects on transfer factor-like activity from human leukocytes and porcine spleen dialysate. *International Journal of Biochemistry* 20(10): 1067-1072.

- 33)** Kasper DL, Fauci AL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. 2015. Harrison's principles of internal medicine. McGraw-Hill Education: New York. pp: 55-100.
- 34)** Kazemi T, Younesi V, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. 2015. Immunotherapeutic approaches for cancer therapy: An updated review. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 44(3):769-79.
- 35)** Khan A, Garrison O, Hill JM, Antonetti A, Hill NO, Gracy RW. 1980. Isolation and Characterization of Immunoepitope from Dialyzable Leukocyte Extract. *Cellular Immunology* 55 (2): 420–27. doi:10.1016/0008-8749(80)90172-0.
- 36)** Lawrence HS. 1955. The Transfer in Humans of Delayed Skin Sensitivity to Streptococcal M Substance and to Tuberculin with Disrupted Leucocytes. *The Journal of Clinical Investigation* 34 (2): 219–30. doi:10.1172/JCI103075.
- 37)** Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, et al. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*. 380: 2095-2128.
- 38)** Mathews CK, van Holde KE, Ahern KG. 2002. *Bioquímica*. Madrid: Pearson, pp: 401-497.
- 39)** Medina-Rivero E, Merchand-Reyes G, Pavón L, Vázquez-Leyva S, Pérez-Sánchez G, Salinas-Jazmín N, Estrada-Parra S, Velasco-Velázquez M, Pérez-Tapia SM. 2014. Batch-to-Batch Reproducibility of Transferon™.

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 88 (enero): 289–94.
doi:10.1016/j.jpba.2013.09.004.

- 40)** Mintz G, Herbold DR, Glaser L. 1975. A fluorescent assay for bacterial cell wall lytic enzymes. *Analytical Biochemistry* 66 (1): 272–78.
doi:10.1016/0003-2697(75)90746-0.
- 41)** Murray, RK. 2010. *Harper bioquímica ilustrada*. México: McGraw-Hill/Interamericana, pp: 51-83.
- 42)** Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. 2009. *Lehninger principios de bioquímica*. Barcelona: Eds. Omega, pp: 183-234.
- 43)** Pereira CC, da Silva M, Langone M. 2004. Enzymatic Synthesis of Monolaurin. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 114 (1-3): 433–45.
doi:10.1385/ABAB:114:1-3:433.
- 44)** Pereira de Sousa I y Bernkop-Schnürch A. 2014. Pre-systemic metabolism of orally administered drugs and strategies to overcome it. *Journal of Controlled Release* 192 (2014): 301–309.
- 45)** Robinson PK. 2015. Enzymes: Principles and Biotechnological Applications. *Essays In Biochemistry* 59 (0): 1–41.
doi:10.1042/bse0590001.
- 46)** Rodríguez-Salazar MC, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Martínez-Torres AC, Zapata-Benavides PZ, López-González JS, Coronado-Cerda EE, Alcocer-González JM, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2017. The novel immunomodulator IMMUNEPOTENT CRP combined with chemotherapy agent increased the rate of immunogenic cell death and prevented melanoma growth. *Oncology Letters* 0:0-0. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6202>.

- 47)**Salinas JN, Estrada-Parra S, Becerril-García MA, Limón-Flores AY, Vázquez-Leyva S, Medina-Rivero E, Pavón L, Velasco-Velázquez MA, Pérez-Tapia SM. 2015. Herpes Murine Model as a Biological Assay to Test Dialyzable Leukocyte Extracts Activity. *Journal of Immunology Research* 2015: 1–9. doi:10.1155/2015/146305.
- 48)**Schrock Robert D. 2012. Cell-Based Potency Assays: Expectations and Realities. *BioProcessing Journal*. 11(3): 4-12.
- 49)**Seaman SA, Tannan SC, Cao Y, Peirce SM, Lin KY. 2015. Differential Effects of Processing Time and Duration of Collagenase Digestion on Human and Murine Fat Grafts. *Plastic and Reconstructive Surgery* 136 (2): 189 – 199. doi:10.1097/PRS.0000000000001446.
- 50)**Segura-Campos M, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. 2010. Efecto de la Digestión en la Biodisponibilidad de Péptidos con Actividad Biológica. *Revista Chilena de Nutrición* 37 (3). doi:10.4067/S0717-75182010000300014.
- 51)**Shire SJ. 2009. Formulation and Manufacturability of Biologics. *Current Opinion in Biotechnology* 20 (6): 708–14. doi:10.1016/j.copbio.2009.10.006.
- 52)**Sierra-Rivera CA, Franco-Molina MA, Mendoza-Gamboa E, Zapata-Benavides P, Santaolalla-Tapia J, Coronado-Cerda EE, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2016. Effect of bovine dialyzable leukocyte extract on induction of cell differentiation and death in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Oncology Letters* 12 (6): 4449–60.

- 53)** Snnok A, Waldman SA. 2013. Advances in Cancer Immunotherapy. *Discovery Medicine*. 15(81): 120-125.
- 54)** Van Wart HE, Steinbrink DR. 1981. A Continuous Spectrophotometric Assay for Clostridium Histolyticum Collagenase. *Analytical Biochemistry* 113 (2): 356–65. doi:10.1016/0003-2697(81)90089-0.
- 55)** Vetto RM, Burger DR, Nolte JE, Vandembark AA, Baker HW. 1976. Transfer Factor Therapy in Patients with Cancer. *Cancer* 37 (1): 90–97.
- 56)** Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. 2009. Characterisation of acid protease expressed from Aspergillus oryzae MTCC 5341. *Food Chemistry* 114 (2): 402–7. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.070.
- 57)** Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, De Vinci C, Pizza G. 2013. Transfer Factor: An Overlooked Potential for the Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Folia Biologica* 59 (2): 53–67.
- 58)** Zhao L, Budge SM, Ghaly AE, Brooks MS. 2011. Extraction, Purification and Characterization of Fish Pepsin: A Critical Review. *Journal of Food Processing & Technology* 02 (06). doi:10.4172/2157-7110.1000126.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Silvia Elena Santana Krímskaya

Candidata para el Grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: EFECTO DEL TRATAMIENTO ENZIMÁTICO SOBRE LA ACTIVIDAD
ANTITUMORAL IN VITRO DEL IMMUNEPOTENT CRP

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacida en Simferopol, URS el 24 de diciembre de 1989, hija de Leonel Santana Vega y Liudmila Borisovna Krímskaya.

Educación: Egresada de la Universidad Nacional Autónoma León – Nicaragua, grado obtenido Licenciada en Bioanálisis Clínico en 2012.

Experiencia Profesional: Bioanalista en el área de Bacteriología en el Hospital de Referencia Nacional Manuel de Jesús Rivera – La Mascota, Nicaragua desde el año 2013 al 2014.